

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE

STUDIJNÍ OBOR: FARMACIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Aplikační limity pro sublingvální podání léčiv 2

Application limits for sublingual drug administration 2

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Vypracovala: Lucie Krupauerová

Hradec Králové, květen 2011

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc. za veškerý čas, který mi věnoval při vypracování diplomové práce, za jeho pomoc, ochotu a rady. Také děkuji Ing. Vladimíru Kubíčkoví, CSc. za poskytnutí podmínek při měření na luminiscenčním spektrofluorimetru, Mgr. Pavlu Berkovi a Mgr. Petru Vrbatovi za získání dat z HPLC.

Poděkování patří také mé rodině za podporu nejen v době psaní této práce.

OBSAH

ABSTRAKT	3
ABSTRACT.....	4
1 ÚVOD.....	5
2 ZADÁNÍ PRÁCE	6
3 TEORETICKÁ ČÁST	7
3.1 Léčivé látky a biofarmaceutický klasifikační systém	7
3.2 Perorální podání	8
3.3 Výhody a nevýhody sublingvální aplikace	10
3.4 Struktura a fyziologie orální mukózy.....	10
3.5 Transportní cesty a mechanismy	12
3.6 Mukoadheze	12
3.7 Orální lékové formy	13
3.7.1 Tablety a pastilky	13
3.7.2 Stripy a filmy	14
3.7.3 Mikročástice a nanočástice	15
3.7.4 Spreje	15
3.7.5 Roztoky a suspenze.....	15
3.7.6 Žvýkácké gumy	15
3.8 Sublingválně aplikované opioidy.....	16
3.8.1 Techniky podání opioidů	16
3.8.2 Racionální použití sublingválních opioidů	16
3.8.3 Morfin	17
3.8.4 Buprenorfin	17
3.8.5 Fentanyl	20
3.9 Dextrany.....	22
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1 Použité látky.....	24
4.2 Přístroje	24
4.3 Pracovní postupy a metody	25
4.3.1 Příprava fosforečnanového pufru.....	25
4.3.2 Donorový roztok kofeinu.....	26
4.3.3 Zásobní roztok dextranu 40 000	26

4.3.4	Roztok dextransu zředěného 1:10	26
4.3.5	Roztok dextransu s přídavkem polyethylenglykolu 300	26
4.3.6	Roztok dextransu se sojovým lecithinem	27
4.3.7	Sublingvální membrány	27
4.3.8	Difúzní cela	27
4.3.9	Permeační standardizace sublingválních membrán	28
4.3.10	HPLC stanovení kofeinu	29
4.3.11	Fluorimetrické stanovení dextransu 40 000	29
4.3.12	Zpracování dat z permeačních pokusů	30
4.3.13	Vysvětlivky k protokolům	30
5	DOKUMENTACE	31
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	67
6.1	K permeaci kofeinu	67
6.2	K permeaci dextransu 40 000	67
7	ZÁVĚRY	76
8	LITERATURA	77

ABSTRAKT

Práce shrnuje informace o sublingválním podání léčiv a přináší novější fakta o léčivých přípravcích sublingvální systémové aplikaci, jakož i základní informace o dextranech a jejich farmaceutickém použití

Experiment je zaměřen na in vitro hodnocení in vitro permeaci dextranu 40 000 (FD40S) sublingvální membránou. Akceptorovou fází byl fosfátový pufr o pH 7,4. K vyhodnocení integrity membrány využívá v prvním úseku permeačního pokusu kofein. Stanovení kofeinu bylo provedeno pomocí HPLC s UV detekcí, stanovení dextranů spektrofotometricky. Průměrné hodnoty fluxů kofeinu použitého k 4 hodinovému permeačnímu ověření integrity a permeačního potenciálu vypreparovaných sublingválních membrán činily ve 3 podskupinách ($n = 6$): $J = 1538,6 \pm 73,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; $J = 1540,3 \pm 82,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; $J = 1500,8 \pm 272,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$

Nebyl zaznamenán vliv doby 6 týdnů uchovávání vypreparovaných membrán při -20°C na jejich permeační vlastnosti. Molekula dextranu FD40S je schopná průchodu přes sublingvální membrány in vitro, ve srovnání s nízkomolekulárním kofeinem je však jeho permeace mnohem více variabilní.

Přídavek 20 % polyethylenglykolu 300 ani přídavek 1,0 % lecitinu do donorových vzorků s 0,1 % dextranu FD40S průnik membránou neovlivnily. Příslušné hodnoty fluxů byly $J = 10,1 \pm 7,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ pro 0,1 % dextran; $J = 8,1 \pm 2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ pro 0,1 % dextran s 20 % PEG 300; $J = 11,8 \pm 6,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ pro 0,1 % dextran s 1 % lecitinu.

ABSTRACT

This thesis briefly summarizes knowledge on the sublingual route of drug administration and brings newer facts about the pharmaceutical sublingual preparations, as well as basic information on dextran and its pharmaceutical use.

The experiment is focused on in vitro evaluation of in vitro permeation of the dextran 40,000 (FD40S) through sublingual membrane. The acceptor phase was always a phosphate buffer, pH 7.4. To evaluate the integrity of the membranes the introducing section of caffeine permeation was used. Determination of caffeine was performed by HPLC with UV detection, the determination of dextran using spectrofluorimetry. The average values of caffeine fluxes applied at 4-hour permeation to assess of the integrity and permeation potential of the sublingual membranes were at 3 subgroups (n = 6): $J = 1538.6 \pm 73.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; $J = 1540.3 \pm 82.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$; $J = 1500.8 \pm 272.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$

No effect of six weeks storage at -20°C on the permeation membrane properties for the dextran molecule passage was noticed. The dextran FD40S molecule is able to pass through the sublingual membranes in vitro, however, permeation is much more variable compared with low molecular weight permeation of caffeine.

The addition of 20 % polyethylene glycol 300, or 1.0 % addition of lecithin to the donor aqueous samples with 0.1% dextran FD40S has no effect on membrane penetration. The pertinent values of fluxes were $J = 10.1 \pm 7.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ at 0.1 % dextran donor; $J = 8.1 \pm 2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ at 0.1 % dextran with 20 % PEG 300; and $J = 11.8 \pm 6.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ at 0.1 % dextran with 1 % lecithin.

1 ÚVOD

K významným terapeutickým požadavkům kladeným na systémově působící léčiva často v řadě případů patří zajištění krátkého nástupu a dostatečně intenzivního farmakologického efektu. Podle povahy léčiva toho lze dosahovat použitím několika typů lékových forem. Srovnávacím etalonem je intravenózní aplikace, která ovšem v praktických situacích není vždy pro pacienta výhodná a akceptabilní a je vždy poměrně drahá.

Stále rostoucí pozornost proto přitahují další cesty podání, ke kterým patří sublingvální aplikační cesta. Její problematice se tato diplomová práce věnuje s tím, že je zaměřena především na získání experimentálních výsledků umožňujících upřesnit limity sublingválního podání výšemolekulárních látek, konkrétně dextranů.

Vznikla v přímé spolupráci s paralelně realizovanou prací Lenky Turnerové, se kterou se výsledkově doplňuje. Přináší experimentální údaje, které jsou pro rozvíjení této tematiky na katedře farmaceutické technologie potřebné a budou využity při dalším výzkumu a vývoji léčivých přípravků.

2 ZADÁNÍ PRÁCE

1. V teoretické části podat kontextový přehled o sublingvální aplikační cestě pro podání léčiv a využití sublingválních membránových filmů. Ve spojitosti s navazujícím experimentem charakterizovat farmaceuticky používané dextrany.

2. V experimentální části:

2.1 Proměřit in vitro hodnoty fluxu kofeinu jako permeačního markeru pro průnik látek sublingvální membránou

2.2 Proměřit in vitro hodnoty fluxu dextranu 40 000 a jeho vodných disperzí s přísady dvou farmaceuticky zajímavých pomocných látek

Díličmi úkoly experimentu jsou:

- a. zvládnutí ex vivo přípravy sublingválních membrán z prasete domácího pro permeační pokusy in vitro
- b. příprava kalibračních vzorků a donorových vzorků kofeinu a vodných donorových vzorků dextranů
- c. zvládnutí HPLC metodiky stanovení kofeinu v akceptorové fázi z permeací
- d. osvojení fluorescenčního spektrometrického stanovení v akceptorové fázi z permeací
- e. realizace permeačních pokusů na cca 15 permeačních komůrkách včetně navazujícího stanovení permeantů
- f. kompletní výpočty hodnot fluxů kofeinu a zadaných dextranů
- g. souhrnné vyhodnocení pokusů s formulací předběžných závěrů

Předpokládá se vypracování Experimentální části v přímé spolupráci s paralelně probíhající další diplomovou prací Lenky Turnerové s následnou samostatnou prezentací pouze vlastních podkladů a výsledků.

3. Hlavní cíle práce

3.1 Precizace metodiky preparace sublingválních membrán

3.2 Ověření integrity biologických membrán nízkomolekulárním permeantem

3.3 Orientační vyhodnocení in vitro permeability dextranů sublingvální membránou na základě změření a vyčíslení hodnot příslušných fluxů

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Léčivé látky a biofarmaceutický klasifikační systém

V současné době se více než 70 procent léčiv podává perorálně. Léčivo musí být po polknutí absorbováno, musí dojít k jeho průchodu přes membránu gastrointestinálního traktu. Dále je v organismu distribuováno, aby nakonec dosáhlo cílových struktur. Poté je léčivo metabolizováno a vyloučeno z organismu. Nejdůležitější fází pro požadovaný účinek léčiva je jeho absorpce a distribuce.

Permeabilita léčiva po perorálním podání je určována řadou faktorů. Jedním ze zásadních je přitom rozdělovací koeficient, poměr rozpustnosti léčivé látky ve vodě a lipidech. Právě v této oblasti existují možnosti využití absorpce léčiv přes orální mukózu.

Biofarmaceutický klasifikační systém (BCS) se užívá od roku 1995 a má při vývoji nových léčiv stále větší význam. Jedná se o nový pohled v oblasti hodnocení bioekvivalence, založený na nových vědeckých principech. Znalost využití tohoto systému umožňuje snižovat náklady na vývoj a výrobu nových léků.

Pokud chceme klasifikovat látky dle BCS, je třeba znát jejich rozpustnost, dávku a intestinální permeabilitu. Tuto klasifikaci lze s přesností použít pouze pro pevná, perorálně podávaná léčiva, rychle se rozpadající, obsahující léčivou látku s vysokou rozpustností a permeabilitou. Podmínky pro ostatní třídy nejsou ještě zcela jasné.

Tři základní parametry pro BCS:

1. Dávka – dle WHO byla stanovena nejvyšší doporučená dávka, která se může v některých zemích lišit, v souvislosti s příslušnou preskripcí.
2. Rozpustnost – hodnoty jsou udávány v mg/ml měřené při hodnotách pH 1-7,5 a teplotě 37°C. Látka je považována za vysoce rozpustnou, pokud je dávka látky rozpustná v méně než 250ml vody a rozmezí pH 1-7,5. Látka je rychle rozpustná, pokud se více než 85% podané dávky rozpustí během 30 minut v roztoku pufru o objemu 900ml.
3. Permeabilita – vychází z dat získaných od zvířecích modelů, buněčných kultur nebo lidí. Látka je vysoce permeabilní, pokud je absorbováno více jak 90% podané dávky.^{1,2}

BCS dělí látky podle rozpustnosti a permeability do 4 základních skupin:

A. vysoká rozpustnost – vysoká permeabilita

V tomto případě jsou léčivé látky dobře absorbovatelné, limitujícím faktorem pro rychlost absorpce je rozpustnost příslušné léčivé látky, a pokud jde o rychle se rozpadající lékové formy je to přítomnost potravy v žaludku. Disoluční profil je dobře definován a je dobře opakovatelný.

B. nízká rozpustnost – vysoká permeabilita

Požadavkem je větší znalost disolučního profilu, protože rozsah a rychlost absorpce je vyšší, kdežto rozpustnost je nižší. Hlavním měřítkem absorpce je disoluce, která je pomalejší než v prvním případě. Lze tedy očekávat větší odlišnosti i v rámci formulace léčivého přípravku.

C. vysoká rozpustnost – nízká permeabilita

Kontrolním krokem celkové rychlosti absorpce léčivé látky je permeabilita. Je opět třeba podrobně znát disoluční profil. Rychlost a rozsah absorpce může být pro tuto třídu ještě více variabilní. Pokud je rozpad léčivého přípravku rychlý, např. pokud se 85% léčiva rozpadne do 15 minut, tak rozdíly v biodostupnosti budou dány spíše průchodem gastrointestinálním traktem, náplní lumina nebo průchodem přes membránu, než faktory vyplývajícími ze složení lékové formy.

D. nízká rozpustnost – nízká permeabilita

Poslední třída představuje léčivé látky, které pro perorální cestu podání nejsou vhodné. Tyto látky mají nízkou biologickou dostupnost,³ a je tedy na místě uvažovat o jiných možnostech podávání. Jednou z nich může být právě sublingvální podání.

3.2 Perorální podání

Nejčastější, nejpohodlnější, nejekonomičtější a nejjednodušší typ podání léčivé látky je perorální podání. Odpadá při něm nutnost aplikace v přítomnosti lékaře, popř. kvalifikované zdravotní sestry, a není to invazivní podání. Nevýhodou může být nepříjemná chuť léku, dráždění žaludeční sliznice, pomalejší vstřebávání, jež může být ovlivněno mnohými faktory jako je přítomnost potravy v zažívacím traktu, příjem interagujících složek potravy s léčivem apod. Zároveň dochází k first-pass efektu, při kterém vlivem řady enzymů dochází k metabolismu mnohých látek a tím k poklesu množství léčivé látky, která se dostane do systémového oběhu.⁴

Tab. 3.1 Přehled nejčastějších cest podání léčiva⁵

systémová aplikace
<ul style="list-style-type: none">• enterální aplikace – ke vstřebání léčiva dochází především cestou GIT<ul style="list-style-type: none">○ perorální○ rektální○ (sublinguální a bukalní)• parenterální aplikace – při vstřebávání se obchází GIT<ul style="list-style-type: none">○ injekční<ul style="list-style-type: none">▪ intravenózní▪ intramuskulární▪ subkutánní▪ intradermální▪ intraarteriální▪ intrakardiální▪ intrathekální▪ intraspinální▪ intraarteriální▪ do kostní dřeně (intraoseální)○ inhalační○ transdermální
lokální aplikace
<ul style="list-style-type: none">• na kůži• na sliznice• na sliznice GIT (léčivo se nevstřebává)

Z tohoto hlediska se jako vhodná alternativa jeví podání v prostoru dutiny ústní. Při tomto podání prochází látky přes dobře prokrvenou sliznici dutiny ústní do systémového řečiště. Protože krev není vedena přímo do portálního řečiště, je potlačen first-pass efekt. Stále však zůstává výhoda aplikace do dutiny ústní, která je jednou z nejjednodušších. Dvě nejběžnější varianty jsou podání bukalní a sublinguální. Oblast bukalního podání je poměrně dobře prozkoumána a také využívána. Proto se dnes zaměřuje pozornost na oblast sublinguálního podání léčiv, které se zdá být velice dobrou alternativou především pro léčiva vyžadující rychlý nástup účinku.

3.3 Výhody a nevýhody sublingvální aplikace

Sublingvální podání léčiv má řadu výhod. Především využívá plochu tenké membrány, která je bohatě prokrvená. Cévy, které tuto oblast prokrvují, obcházejí portální řečiště. Podání nepotřebuje asistenci, je nenáročné a neomezuje pacienta. Využívá lékových forem typu tablet, sprejů, filmů, jejichž aplikace je pro pacienta příjemnější než například u čípků. Zároveň je to vhodná alternativa pro pacienty, kteří mají problém s perorálním užíváním léčiv, například při problémech s polykáním tablet, při nevolnostech a zvracení, při patofyziologickém problému v zažívacím traktu. Potíže mívají především starší pacienti a malé děti. Díky významnému prokrvení sublingvální membrány dochází k rychlému nástupu účinku. Této skutečnosti lze použít u léčiv, u kterých potřebujeme, aby působila co možná nejrychleji.

Významnou výhodou oproti perorálnímu podání je nízká variabilita absorpce. V gastrointestinálním traktu je vstřebávání ovlivněno složkami potravy, rozdílným pH nebo střevní motilitou. Přesto také míra salivace a některé infekce mohou tuto variabilitu sublingvální absorpce zvýšit.

Je samozřejmé, že i sublingvální cesta má některé nevýhody. Existují limity pro velikost molekuly látek, které mohou být absorbovány, existuje problém iritace orální mukózy, mukos a sliny snižují retenční čas, dobu uvolňování léčivé látky z lékové formy a tudíž i možnost látky absorbovat se. Vývoj těchto forem je také náročný a nákladný, s nejistým výsledkem.⁹

3.4 Struktura a fyziologie orální mukózy

Mukóza dutiny ústní se skládá z několika základních vrstev. Tvoří je mukos, keratinizovaná část epitelu (jen v určitých oblastech), epitel, bazální membrána, lamina propria, submukóza. Jednotlivé vrstvy se pak stávají bariérami pro přestup látek přes membránu.

Mukos obsahuje glykoprotein mucin, který se skládá z proteinového řetězce a postranních oligosacharidových řetězců zakončených kyselinou sialovou, sulfonovou nebo L-fukosou. Asi 25 % proteinového řetězce je bez oligosacharidových zbytků a podléhá enzymatickému štěpení. Tato část je ale bohatá na aminokyseliny, které vytváří disulfidické můstky. Kolem 75 % řetězce je glykosylováno. Koncová kyselina

sialová a sulfáty zajišťují, že mucin při fyziologickém pH vykazuje záporný náboj. Má významné kohezivní vlastnosti, díky nimž se pevně váže k buňkám epitelu a vytváří souvislou gelovou vrstvu, chovající se jako neneutronovská kapalina. Je produkován slinnými žlázami a může být dvojího charakteru – serózní nebo viskózní.⁶ Tato struktura hraje důležitou roli v mukoadhezi řady lékových forem.⁷

Epitel v dutině ústní je vrstevnatý šupinatý, může být různě keratinizován. Keratinizovaný epitel je dehydratovaný, mechanicky tvrdý, drsný a chemicky odolnější. Najdeme ho v částech dutiny ústní, které jsou mechanicky namáhané, jako dásně nebo tvrdé patro. Oproti němu nekeratinizovaný epitel je více poddajný a vyskytuje se na měkkém patře, vnitřní straně dásní, spodní části dutiny ústní a rtech. Lze jej také rozdělit na několik vrstev, podle morfologie buněk. Blíže k povrchu jsou buňky více oploštělé, většího průměru, obsahují více proteinů a méně organel a už nejsou schopné růstu.⁸

Bazální membrána – odděluje epitel od lamina propria a je to vrstva buněk, která se vyznačuje neustálým dělením, proliferací

Lamina propria – vrstva mezi bazální membránou a submukózou obsahuje kolagen, elastická vlákna a další buněčné komponenty. Zasahují sem krevní kapiláry, které zajišťují výživu, a nervová vlákna poskytující inervaci. Zároveň skrze místní krevní cévy léčivá látka vstupuje do systémové cirkulace.

Submukóza – podslizniční vrstva tvořená vazivem a obsahující cévy a nervy.

V dutině ústní najdeme také množství slinných žláz. Jedná se o velké a malé slinné žlázy. Slina je hypotonický vodný roztok obsahující různé množství mucinu, enzymy, protilátky a anorganické ionty. Složení závisí na tom, jakými buňkami je slina produkována. Jestli bude spíše serózní nebo viskózní.⁹

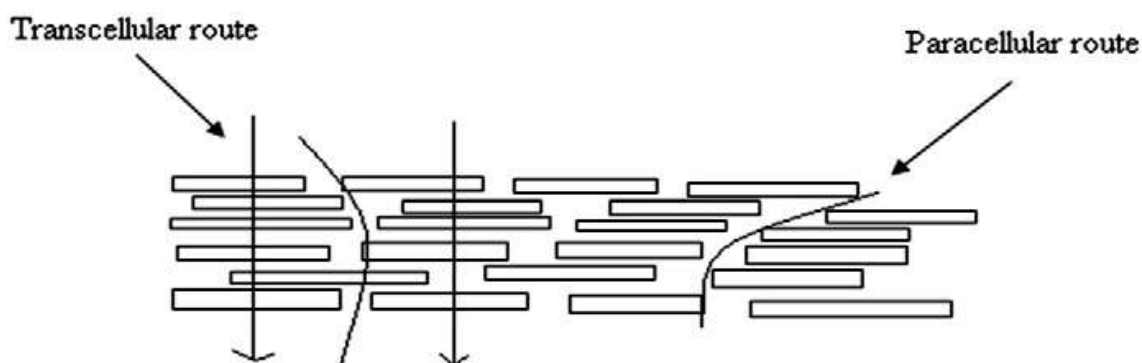
Všechny tyto komponenty zajišťují poměrně dobrou bariéru, která chrání dutinu ústní před poraněním a infekcí, před vstupem cizorodých látek do krve. Přesto je dutina ústní se svou membránou jednou z možných cest pro aplikaci léků. Je především bohatě prokrvená, poměrně tenká a látky, které se vstřebají dosáhnou ihned systémové cirkulace a vyhnou se tedy průchodu játry. Je to vhodná alternativa pro látky nestabilní, rychle enzymaticky odbourávané. Příkladem mohou být peptidy a proteiny. Propustnost orální mukózy je někde mezi propustností kůže a dolních částí zažívacího traktu, bukalní je o trochu méně propustná než sublingvální. Tloušťka

bukální membrány je v rozmezí 500 μm až 800 μm . Sublingvální je ještě o něco tenčí, průměrně 100 μm až 200 μm , a umožňuje proto poměrně rychlou absorpci.⁹

3.5 Transportní cesty a mechanismy

K permeaci látek přes membránu dochází dvěma možnými způsoby, jedná se o cestu transcelulární (přes buňky) a paracelulární (prostorem mezi buňkami).⁷

Obr. 3.1 Transportní cesty biologickou membránou⁷



Transcelulární je přestup látek přes buněčnou membránu, pro který je třeba, aby látka byla dostatečně rozpustná nejen ve vodě, ale i v lipidech. Tento parametr vyjadřuje rozdělovací koeficient. Látky s malou molekulou a lipofilní mohou být absorbovány pasivní difúzí řídicí se Fickovým zákonem. Monosacharidy, aminokyseliny a jiné malé sloučeniny mají vlastní přenašečové systémy. Další možností je endocytóza.

Paracelulární přestup je průchod látek mezibuněčnými prostory. V nich se nachází mezibuněčná hmota, spoje mezi buňkami, především desmozómy, a lipidický materiál, které společně opět vytváří permeační bariéru. Tuto cestu využívají hlavně sloučeniny s malou molekulou rozpustné ve vodě, díky přítomnosti lipidů však mohou penetrovat i lipidické částice.⁹

3.6 Mukoadheze

Bioadheze je termín používaný pro adhezi mezi dvěma povrchy, z nichž jeden je biologického původu. Mukoadheze pak označuje interakci mezi mukózní membránou a nebiologickým povrchem. Princip mukoadheze je popisován několika faktory, nejdůležitější je přitom adsorpce a difúze. K adsorpci dochází prostřednictvím vodíkových vazeb, Van der Waalsových vazeb a dalších, kdy hydrofilní polymery musí

být nejprve aktivovány vodným prostředím. Následuje difúzní proces, jehož výsledkem je propletení jednotlivých řetězců mukoadhezivního polymeru a řetězců mucinu. Tento děj závisí na mnoha faktorech, jakými jsou molekulová hmotnost polymeru, jeho flexibilita, kapacita vodíkových vazeb, větvení, náboj i hydratace.¹¹

3.7 Orální lékové formy

Orální lékové formy můžeme rozdělit podle místa účinku na systémové, po jejichž aplikaci dochází k absorpci léčivé látky do systémového řečiště, a lokální, u kterých léčivá látka působí přímo v místě podání, v tomto případě v dutině ústní. Obecně se jedná

o lékové formy tekuté, polotuhé a pevné, konkrétněji se používají převážně tablety a pastilky, dále filmy či stripy založené na mukoadhezi, suspenze a spreje.

3.7.1 Tablety a pastilky

Rozlišujeme rychle rozpustné tablety, okamžitě uvolňující léčivou látku, jež se používají především sublingválně, to znamená pro mukózu, která je dobře propustná pro příslušné léčivo a umožňuje rychlý nástup účinku. Jsou tvořeny rozpustnými excipienty jako laktosa, sacharosa nebo manitol. Vývoj se ale také zabývá prodloužením doby absorpce léčivé látky a řízeným uvolňováním léčivé látky.

Tablety i pastilky jsou připravovány obdobným způsobem jako klasické perorální přípravky. V souvislosti se zamýšleným podáním dochází k jejich rozpuštění nebo adhezi. Liší se především tvarem a velikostí, přesto jsou si tyto formy dosti podobné. K rozpouštění obvykle dochází po dobu 30 minut, samozřejmě v závislosti na velikosti a složení. Rozpouštění z velké části určuje pacient intenzitou pohybu jazyka, zvýšená produkce slin zapříčiňuje polykání a ztráty léčiva v zažívacím traktu. Jednotlivé formy mají velkou variabilitu z hlediska absorpce a biodostupnosti. Je to dáno především médiem, ve kterém dochází k rozpouštění, jež se mění a nelze ho kontrolovat. Tablety mohou uvolňovat léčivou látku ve všech směrech nebo pouze některými, což souvisí s vrstvami, které ji tvoří.^{7,10}

3.7.2 Stripy a filmy

Jednou z nejnovějších lékových forem, jsou orální stripy (filmy, membrány, proužky). Dobře prozkoumaná oblast je především oblast bukálních stripů, objevují se ovšem už i stripy sublingvální. Bukální sliznice je lépe přístupná a méně propustná, využívá se tehdy, když rychlý nástup účinku není potřebný. Ten však naopak může být v mnohých případech žádoucí. Takový je třeba příklad trinitrátu glycerolu (tzv. nitroglycerinu), který se užívá při akutní atace anginy pectoris.

Orální stripy jsou tenké pásy, které přilnou k orální mukóze a následně uvolňují léčivou látku. Ideálním systémem je takový, který dobře přilne, kontrolovaně uvolňuje léčivou látku, nedráždí a neobtěžuje. Je třeba u něj zajistit dobrou snášenlivost a přijatelnou chuť. Jde o proužky velikosti poštovní známky, obsahující účinnou substanci a další excipienty. Do těchto systémů mohou být inkorporována mnohá léčiva, problémem zůstává velikost dávky, kterou je daný systém schopen pojmout.

Základními požadavky pro výrobu stripů jsou mukoadhezivní vlastnosti pomocných látek, dále podpora permeace a kontrolované uvolňování aktivní substance. Jako základní komponenty se uplatňují polymery. Do první skupiny patří polymery kationické, anionické a neionogenní, všechny označované jako nespecifické, které interagují

s mucinem. Nejvíce používané jsou polymery hydrofilní. Příkladem jsou deriváty celulosy, kyselina polyakrylová nebo chitosan. Druhou, novější skupinou polymerů, které se více vážou na struktury mukózy, jsou označovány jako cytoadhezivní. Zástupci jsou lektiny a thiolované polymery (thiomery).^{7,11}

Polymery lze používat samostatně nebo k zajištění požadovaných vlastností v kombinaci. Je třeba zajistit dostatečnou pevnost stripu, aby nedošlo k jeho poškození během manipulace. Nesmí být toxický, iritovat a uvolňovat nečistoty. Uvádí se, že obsahuje asi 45 % polymeru v suchém stavu. Měl by rychle adherovat k povrchu a zajišťovat tak permeaci léčivé látky přes membránu.^{7,8,11}

Dalšími složkami jsou plastifikátory, které poskytují flexibilitu, pružnost a ohebnost, sladidla, nebo látky podporující slinění.

Výroba stripů spočívá v extruzi taveniny za tepla. Smíchají se všechny komponenty společně s rozpouštědlem, směs se zahřívá a následně je protlačována v tekutém stavu

z extrudátoru. Dochází k odpaření rozpouštědla a stříhání pásu polymerního materiálu na požadovanou velikost.¹²

3.7.3 Mikročástice a nanočástice

Mikročástice a nanočástice mohou být podávány ve formě vodných roztoků, jako aerosol, či formou past a mastí. Jejich výhodou je pro pacienta pohodlná aplikace. V porovnání s jednodávkovým přípravkem, například tabletou, je rozdíl v kvantu podané dávky léčiva. Podskupinu představují liposómy, které jsou jednou z alternativ pro látky slabě rozpustné a tedy špatně uvolňované lékovými formami.⁷

3.7.4 Spreje

Spreje jsou další alternativou k pevným lékovým formám. Umožňují podání léčivé látky na povrch mukózy a odtud možnou absorpci. Spreje zajišťují dávku léčivé látky ve formě malých částic nebo kapiček a tím snižují časovou prodlevu k uskutečnění absorpce. Takovéto sprejové přípravky jsou k dispozici například pro nitroglycerin, inzulin a další látky.⁷

3.7.5 Roztoky a suspenze

Tekuté lékové formy jsou zastoupeny roztoky a suspenzemi, především vodnými. Jsou určeny zejména pro lokální působení, jedná se o ústní antibakteriální vody a osvěžující přípravky. Tyto lékové formy nemají charakter řízeného uvolňování, mohou poskytnout široký rozsah množství léčivé látky.⁷

3.7.6 Žvýkáci gummy

Žvýkáci gummy jsou jedním z nových přístupů k orálnímu transmukozálnímu podání léků, jsou užitečným prostředkem i pro systémové podávání léků. Mají některé výhody, jakou je třeba řízené uvolňování léčiv po prodlouženou dobu nebo potenciál pro zlepšení variability v uvolňování léčiv. Velikým kladem je pohodlí. Kromě toho pacient může kontrolovat užívání léku pouhou změnou rychlosti nebo intenzity žvýkání. Protože se jedná o otevřený systém, mají žvýkáci gummy některá stejná omezení jako jiné pevné lékové formy.¹⁰

3.8 Sublingválně aplikované opioidy

Opioidy jsou léčiva odvozená od opia. Lze rozdělit na endogenní (endorfiny a enkefaliny), přírodní (pochází z opia) a syntetické. Jsou to látky, které se používají zejména v analgesii. Působí přes opioidní receptory μ , δ , κ v centrální nervové soustavě i na periférii. Kromě požadovaného analgetického účinku tlumí dechové centrum, snižují motilitu GIT nebo navozují sedaci. Významně vyvolávají závislost.

Pro své analgetické účinky se používají v terapii různých typů bolesti, především pak bolesti chronické. Proto je snaha usnadnit pacientům alespoň aplikaci těchto léčiv, aby to nebylo namáhavé, protože mohou být zesláblí, či mít obtíže jiného druhu. Proto jsem se zaměřila na sublingvální formy opioidů.

3.8.1 Techniky podání opioidů

Opioidy jsou stále hlavní skupinou léčiv pro léčbu závažné akutní bolesti. Tradiční metody podání opioidů (orální, intramuskulární, podkožní) jsou účinnější, pokud jsou režimy jejich podání individuální a dávky titrované ke konkrétnímu účinku. Pro pacientem řízenou analgesii v léčbě okamžité bolesti se používají také transmukozální, konkrétněji intranasální, sublingvální a bukální formy léčivých přípravků a především přípravky transdermální, doplněné iontoforézou. V porovnání a parenterálním podáním je u perorálního podání nutností zvýšit dávky opioidů, pokud bereme v úvahu dopad first-pass efektu. Hovoříme o takzvaných ekvianalgetických dávkách. Při transmukozálním podání v rámci dutiny ústní však dochází k rychlé absorpci a omezení first-pass efektu. Mnohé přípravky jsou používány v řízení střední až silné bolesti při akutní, chronické nebo paliativní péči. Je to například fentanyl, pro úlevu od bolesti u opioid-tolerantních pacientů, nebo buprenorfin, který musí být podáván sublingválně, aby se zabránilo jeho metabolizaci a tak jeho neefektivnímu využití.¹³

3.8.2 Racionální použití sublingválních opioidů

Sublingvální podání opioidních analgetik je základem léčby bolesti u pacientů vázaných na lůžko a neschopných polykání. Také je to potencionálně užitečný způsob podání v situacích, kdy není možné orální podání a další cesty jsou nepraktické a nevhodné. Jak už jsem zmínila dříve, je to z důvodu rychlého nástupu a vyloučení first-pass efektu. Sublingvální podání nabízí mnohé výhody ve srovnání s neperorálními cestami, v rámci

domácích podmínek pacientů. Jsou to nižší náklady, neinvazivita, pohodlí, jednoduchost. Za určitých okolností, jakým je existence tumorů zažívacího traktu, střevní obstrukce, dysfagie, odynofagie, časté nevolnosti a zvracení, nebo snížená úroveň vědomí

u umírajících pacientů je to vhodná alternativa k perorálnímu. Také když intravenózní cesta není přístupná, subkutánní je neuspokojivá (kvůli vodnatosti, koagulopatii, oběhové nedostatečnosti či neochotě pacienta nebo pečovatele akceptovat její invazivitu, či nepohodlí), a rektální cesta je také nemožná (průjem, zácpa, fekální zaklínění, trhlina nebo estetická nepříjemnost pro pacienta, pečovatele). Sublingvální podání je v takových případech racionální volbou. Nevýhodou je chuť, zřídka se objevuje lokální tvorba vředů, nutná je potřeba ponechat léčivo na místě podání po několik minut.¹⁴

3.8.3 Morfin

Hlavní zástupce skupiny opiátů. Je používán u pacientů s nádorovým onemocněním, kteří právě trpí častou nevolností a zvracením, nebo pacientů, kterým je problematické aplikovat morfin parenterálně. Morfin poměrně málo lipofilní, při fyziologickém pH je jeho pKa 7,9, což zapříčiňuje jeho asi 90% ionizaci v dutině ústní. Oproti ostatním (buprenorfin, fentanyl) má nižší opioidní potenciál. Mnohá farmakokinetická data ukazují nízkou sublingvální absorpci a podobnost sublingválního a perorálního podání. Názory na sublingvální podání se různí. Pro kvalifikované vyjádření není dostatek podkladů.¹⁵

Sublingválně podávaný morfin se jeví jako vhodná alternativa také v pediatrii, jak z několika málo studií vyplývá. Jedna studie byla prováděna u dětí v analgesii při odstraňování tonsil. Tyto byly rozděleny do dvou skupin, jedné byl podáván sublingvální morfin, druhé intravenózní ve stejné dávce. Hodnocena byla bolest, sedace, probuzení se z analgesie, kromě délky trvání tu nebyly žádné významné rozdíly. Je však potřeba provést širší výzkum této možnosti.¹⁶

3.8.4 Buprenorfin

Jedná se o syntetický analog opioidních alkaloidů, parciálního agonistu μ -receptorů s antagonistickými vlastnostmi na κ -receptorech. Má vysokou afinitu a nízkou až

střední vnitřní aktivitu na μ -receptorech. Úspěch v sublingválním použití v terapii nádorové bolesti zaznamenal buprenorfin již v sedmdesátých letech minulého století. Byl podáván mnohými cestami – epidurálně, subarachnoidálně, subkutánně, intravenózně, intramuskulárně i transdermálně. Jedná se o lipofilní molekulu, se špatnou perorální (10%), ale dobrou sublingvální biodostupností (50%).¹⁴

Využití u pacientů s osteoartritickou bolestí

Byla provedena randomizovaná, dvojitě zaslepená studie pro porovnání efektivity buprenorfinu při transdermálním a sublingválním podání. Sublingvální tablety Temgesic® jsou tablety obsahující buprenorfin hydrochlorid.

Hodnoceny byly vedlejší dávky, noční buzení, kvalita života, přijatelnost léčby pro pacienta, bezpečnost léčby (výskyt nauzey, zvracení, bolesti hlavy, zácpy, závratě a dalších vedlejších reakcí) v souvislosti také s předcházející léčbou. Ukázalo se, že obě možnosti přinesly dobrou kontrolu bolesti, avšak transdermální náplasti poněkud lepší compliance pacientů.¹⁷

Léčba neonatálního abstinenčního syndromu

Pokud je plod během těhotenství vystaven užívání drog, může to vést k novorozeneckému abstinenčnímu syndromu, který vede k prodloužení hospitalizace. Buprenorfin, jakožto parciální agonista μ -receptorů, se používá k detoxikaci dospělých, nikdy však nebyl podán novorozencům s tímto syndromem. Cílem zajímavé studie bylo prokázat proveditelnost a bezpečnost sublingválního podání a porovnat účinnost vzhledem ke standardní terapii. Byla provedena randomizovaná, otevřená, řízená studie na 26 dětech. Látka se podávala ve formě roztoku. Prokázala, že sublingvální buprenorfin je v kontrole neonatálního abstinenčního syndromu velmi účinný. Průměrná doba léčby se oproti klasické snížila. Byla dobře snášena. Závěrem studie bylo, že sublingvální buprenorfin je bezpečný a může být novou metodou v léčbě syndromu.¹⁸

Buprenorfin a naloxon – terapie závislosti na opiátech

Buprenorfin v kombinaci s naloxonem (Suboxone®) je používán k léčbě závislosti na opiátech a je k dispozici ve formě sublingvální tablety. Naloxon neovlivňuje účinek buprenorfinu, pouze zabraňuje zneužití tohoto léčiva, vyvoláním syndromu z vysazení

při parenterálním podání. Je to antagonist μ -receptorů. Tablety se aplikují pod jazyk, následně dochází k disoluci a uvolnění léčivé látky. Trvá to několik minut, během kterých musí být tableta držena pod jazykem. Jde o hexagonální bikonvexní tablety s logem dýky na jedné straně a N2(8) na straně druhé. Tablety obsahují monohydrát laktosy, manitol, kukuřičný škrob, povidon K30, bezvodou kyselinu citronovou, citronan sodný, magnesium stearát a acesulfam draselný.¹⁹

Protože compliance při užívání tablet byla nižší než 75%, hledaly se nové formy. Na podzim roku 2010 schválila americká FDA nový sublingvální film s kombinací buprenorfinu a naloxonu pro léčbu závislosti. Kromě jiného jde o přípravek, který se má rozpouštět dvakrát rychleji než tablety. S tímto přípravkem přišla firma Reckitt Benckiser ve spolupráci s firmou MonoSol, která má vlastní technologii s označením PharmFilm®.^{20,21}

Obr. 3.2: Suboxone® sublingvální tablety²²



Obr 3.3: Suboxone® sublingvální film^{23,24}





3.8.5 Fentanyl

Fentanyl je jedním z opioidů, jenž se využívá v terapii průlomové bolesti. Ta je charakterizována jako rychle nastupující bolest střední až vysoké intenzity, obvykle trvající 30 minut a opakující se 1 až 4krát denně. Často se objevuje u pacientů s maligním metastázujícím onemocněním. Doporučuje se, aby tato bolest byla léčena látkami

s krátkou dobou účinku, jejichž účinek rychle nastupuje a jsou rychle eliminovány. Tímto dochází i redukci mnohých nežádoucích účinků opioidů (nauzea, závrť nebo zácpa). Fentanyl je malá lipofilní molekula, která může být podávána různými cestami, včetně transmukozální a sublingvální. Rychlá absorpce přes mukózu je důležitá pro rychlý nástup účinku. Jedná se o silný opioid, který se právě hodí pro léčbu silné průlomové bolesti. V současné době jsou k dispozici transmukozální bukalní formy fentanylu. Sublingvální prostor nabízí pro aplikaci vhodnou alternativu, protože je více propustná a zajišťuje vyšší biologickou dostupnost. Existují různé formulace fentanylcitrátu. Mají podobu malých diskretních tablet, jsou založeny na směsi ve vodě rozpustných nosičů obalených mukoadhezivním polymerem a částic aktivní substance.²⁵

Jedna ze studií popisuje sublingvální tabletu fentanylcitrátu (Rapinyl®), která je tvořena ve vodě rozpustným nosičem obaleným bioadhezivním materiálem s obsahem fentanylcitrátu. Tableta se rychle rozpadá na částice obsahující nosič (manitol), léčivou látku

a bioadhezivní komponentu. Tyto částice adherují k mukóze, následně jsou rozpouštěny a s nimi uvolňován i fentanylcitrát. Je zajištěna optimální expozice účinné látky

k rozpouštědлу a její zadržení v dutině ústní. Fentanyl-citrát se rychle vstřebává a prvních rozpoznatelných koncentrací dosahuje za asi 10 minut²⁶

Byla provedena studie, která měla zjistit, zda fentanyl podávaný ve třech různých dávkách (100 µg, 200 µg a 400 µg) poskytuje efektivní analgetický účinek a úlevu od bolesti u opioid-tolerantních pacientů s rakovinou. Jednalo se o randomizovanou, multicentrickou, dvojitě zaslepenou studii s rychle se rozpadající sublingvální formou fentanylu. Úleva se dostavila asi po 5 minutách, čímž byla prokázána rychlá absorpce. V porovnání s placebem bylo snížení intenzity bolesti patrné u všech tří dávek, nejvýznamněji u 400 µg a to po 15 minutách.²⁵

Další ze studií se zabývala bioekvivalencí sublingválního a bukalního podání při použití bukalních tablet fentanylu. Byla provedena na skupině zdravých dobrovolníků, podávány byly bukalní tablety s obsahem 400 µg fentanylu. K bloádě opioidních receptorů a minimalizaci účinků fentanylu byl zároveň také podáván naltrexon. Byly odebírány a v určitých časových intervalech hodnoceny krevní vzorky. Vyhodnocení vedlo k závěru, že po obou podáních došlo k rychlé absorpci fentanylu a vstřebané množství i čas byly stejné. Studie hodnotí tyto dvě podání jako bioekvivalentní, a tedy užití bukalních tablet jako vhodnou alternativu u pacientů např. s xerostomií (suchost v ústech, kdy je sublingvální dutina více hydratována, a tedy je pro podání vhodnější).²⁷

Abstral® (Rapinyl®)

Jde o rychle se rozpadající sublingvální tabletu fentanyl-citrátu určena pro orální transmukozální podání umožňující vytitrování potřebné dávky. V lednu 2011 bylo schváleno FDA jeho uvedení do distribuce v USA. V Evropě začal jeho prodej již v roce 2009. Práva vlastní společnost Orexo AB (resp. její partnerská společnost ProStrakan).²⁸ Abstral® tablety se vyrábí v několika koncentracích a tomu odpovídajících tvarech, konkrétně 100 µg (kulatá), 200 µg (oválná), 300 µg (trojúhelníkovitá), 400 µg (tvar diamantu), 600 µg („D“ tvar) a 800 µg (tvar tobolky). Podává se pacientům, kteří jsou považováni za opioid-resistentní u trvalé nádorové bolesti, tj. pokud užívají nejméně 60 mg perorálního morfinu jedenkrát denně, 25 µg transdermálního fentanylu za hodinu nebo další ekvivalentní dávky jiných opioidů.

Tyto tablety by měly být podávány přímo pod jazyk, ale neměly být polykány. Je potřeba zajistit, aby se rozpustily v dutině ústní bez žvýkání nebo sání. Pacienti nesmí jíst ani pít dokud nedojde k rozpuštění. Sliznici lze zvlhčit před podáním, aby došlo k rozpouštění v ústech i u pacientů se suchou sliznicí.

Optimální dávka by měla být titrována a to směrem nahoru, podle potřeb pacienta. Počáteční dávka by měla být 100 µg Abstralu, pokud nedojde do 15-30 minut ke zlepšení, podává se dalších 100 µg, poté tableta s vyšší koncentrací, dokud nedojde k zajištění přiměřené analgesie. Během jedné epizody by se neměly užít více jak 2 tablety.

Tableta obsahuje manitol E421, mikrokrytalickou celulosu, sodnou sůl kroskarmelosy a magnesium stearát.²⁹

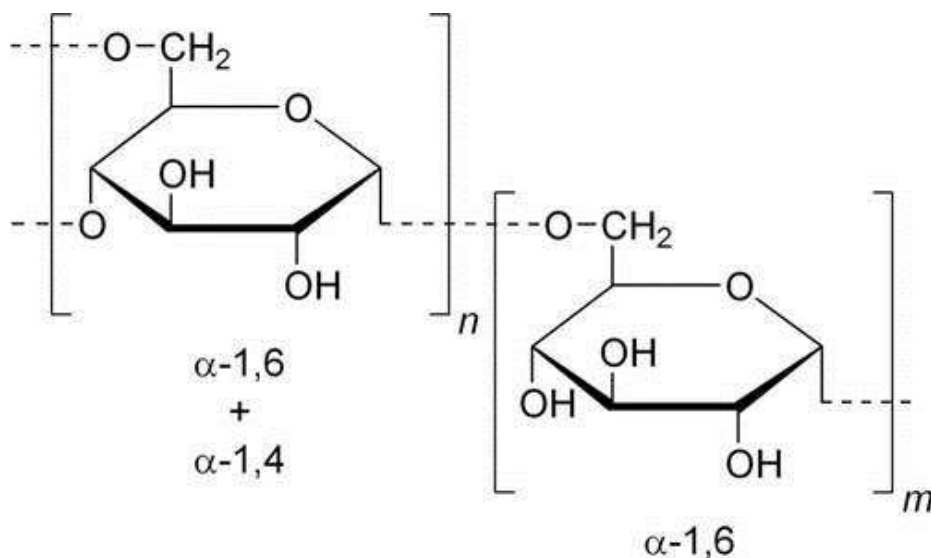
Obr. 3.4 Přípravek Abstral®, sublingvální tablety³⁰



3.9 Dextrany

Dextrany jsou polysacharidy s molekulovou hmotností větší než 1 000. Jsou to lineární molekuly tvořené řetězcem glukopyranosových jednotek spojených α -vazbami. Z hlediska struktury můžeme dextrany rozdělit do tří tříd. První skupina má kostru tvořenou vazbami $\alpha(1 \rightarrow 6)$ a od ní vycházejí vedlejší řetězce $\alpha(1 \rightarrow 2)$, $\alpha(1 \rightarrow 3)$, $\alpha(1 \rightarrow 4)$. Dextrany této třídy se liší molekulovou hmotností, prostorovým uspořádáním, typem a stupněm větvení, délkou větvících se řetězců a to v závislosti kultivačních podmínkách a charakteru mikrobů. Základní kostra dextranů druhé třídy je tvořena jednotkami glukopyranosy pospojovanými vazbami $\alpha(1 \rightarrow 3)$ a $\alpha(1 \rightarrow 6)$ a větví se $\alpha(1 \rightarrow 3)$. Třetí třída (mutanti) obsahuje za sebou jdoucí $\alpha(1 \rightarrow 3)$ glukopyranosové jednotky s větvením $\alpha(1 \rightarrow 6)$.

Obr. 3.5 Dextran - struktura³¹



Fyzikální a chemická odlišnost dextranů je dána bakteriálním kmenem, který je produkuje a dalším postupem výroby. Všechny dextrany jsou bílé, bez chuti a pevného skupenství. Jsou dobře rozpustné ve vodě a jejich roztoky se chovají jako newtonovské kapaliny. Viskozita roztoků je závislá na koncentraci, teplotě a molekulové hmotnosti. Hydroxylové skupiny nabízejí velkou možnost tvorby derivátů a tyto představují širokou, stále ještě neprozkoumanou, oblast biokompatibilních a bezpečných látek.³²

Dextrany jsou syntetizovány ze sacharosy prostřednictvím bakterie *Leuconostoc mesenteroides* a *Streptococcus mutans*. V lékařství jsou využívány pro své antitrombotické vlastnosti. Snižují agregaci erytrocytů a adhezivitu krevních destiček. Větší molekuly pak uplatňují své osmotické vlastnosti a využívají se k léčbě hypovolémie.

Dále se využívají v očním lékařství jako lubrikant do očních kapek. Intravenózní roztoky účinkují jako plazmaexpandery, používají se v situacích, kdy dojde ke ztrátě krve a není možná její náhrada.³¹

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité látky

Azid sodný (p.a.)	Chemapol, Praha
Dihydrogenfosforečnan sodný (ČL 2005)	Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové
Hydrogenfosforečnan sodný (ČL 2005)	Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové
Fluorescein isothiokyanát-dextran FD40S	Sigma-Aldrich, Praha
Chlorid sodný (ČL 2005)	Penta, Praha
Kofein (ČL 2005)	Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové
Lecithin sojový pro inj.	Fresenius, Praha
Polyethylenglykol 300; (PEG 300)	Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové
Kyselina mravenčí (p.a.)	Penta, Praha
Methanol pro HPLC	Sigma-Aldrich, Praha
Čištěná voda (ČL 2005)	UK-FAF, Hradec Králové
Voda na injekci (ČL 2005)	Ardeapharma, Ševětín
Voda pro HPLC ultračistá	UK-FAF, Hradec Králové

Všechny suroviny byly podle deklarací výrobců a dodavatelů kvality lékopisné nebo vyšší. Čištěná voda a voda pro HPLC pochází z centrální přípravy na UK-FaF a nebyla podrobena lékopisným zkouškám.

4.2 Přístroje

Analytické váhy Kern 440-45N	Kern Sohn GmbH, Německo
Analytické váhy Sartorius 2004MP	Sartorius GmbH, Německo
Digitální pH metr Gryf 209 L	Gryf HB s.r.o., Česká republika
Vodní lázeň, Grant JB5	Grant Instruments, Velká Británie
Elektronická míchačka Variomag	Labortechnik, Německo
Magnetické míchadlo, Telesystem	H-P Labortechnik, Německo
Termostat BT50	Labor. přístroje, Česká republika

Sestava HPLC Agilent Techn.1200

Agilent Technologies, USA

- Isokratické čerpadlo: Iso Pump G1310A
- UV/VIS detektor: VWD G1414B s proměnnou vlnovou délkou
- Kolony: Zorbax Eclipse plus C18, oktadecylsilanový sorbent, průměr 4,6mm, délka 150mm, zrnitost 5mikrometrů
- Software: ChemStation

Spektrofluorometr, Aminco Bowman Series 2,

Thermo Fisher, USA

- Křemenná kyveta 1 cm
- Software: AB2

4.3 Pracovní postupy a metody

4.3.1 Příprava fosforečnanového pufru

Pufr o pH 7,4 jsme použili jako akceptorovou fázi pro přestup kofeinu i dextranu. S přidavkem azidu sodného také pro maceraci sublingválních membrán.

Složení:

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	2,1 g/l
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	19,1 g/l
NaCl	4,4 g/l
(příp. NaN ₃)	0,02 g/l)

Postup:

- Odděleně jsme rozpouštěli fosforečnany (dihydrogenfosforečnan v 500ml a hydrogenfosforečnan ve 400ml vody)
- Přidali jsme 500ml dihydrogenfosforečnanu k cca 200ml hydrogenfosforečnanu
- Změřili pH
- Doladili pH za stálého míchání (na míchačce s magnetickým míchadlem) pod pH-metrickou kontrolou postupným přidáváním roztoku hydrogenfosforečnanu na požadovanou hodnotu
- Zjistili objem připraveného pufru odměrným válcem
- Navázili a rozpustili adekvátní množství chloridu sodného pro izotonizaci

4.3.2 Donorový roztok kofeinu

Připravený 4% roztok kofeinu jsme použili jako donorový standard pro permeace jednotlivými sublingválními membránami.

Složení:

Kofein	1,0 g
Čištěná voda	24,0 g

Postup: Kofein jsme navážili na analytických vahách a kvantitativně přesunuli do odměrné baňky. Doplnili jsme čistou vodou v odměrné baňce 25 ml po rysku.

4.3.3 Zásobní roztok dextranu 40 000

Složení:

Dextran 40 000	50,0 mg
Voda na injekci	4,95 g

Postup: Na analytických vahách jsme navážili přesné množství dextranu, které jsme kvantitativně přenesli do vialky a rozpustili v příslušném množství vody na injekci. Roztok jsme zabalili do alobalu a dali do lednice.

Připravený 1 % roztok dextranu jsme použili pro přípravu konkrétních zkušebních roztoků použitých k permeaci a také k sestavení kalibrační křivky pro fluorescenci.

4.3.4 Roztok dextranu zředěného 1:10

Složení:

Zásobní roztok dextranu	1,5 ml
Voda na injekci	13,5 ml

Postup: Zásobní roztok dextranu jsme doplnili vodou na injekci. Tímto jsme připravili 15 ml 0,1 % roztoku dextranu. Tento roztok jsme použili i k přípravě dalších zkušebních roztoků.

4.3.5 Roztok dextranu s přidavkem polyethylenglykolu 300

Složení:

Zředěný roztok dextranu 40 000	4,0 ml
Polyethylenglykol	1,0 ml

Postup: Ke zředěnému 0,1 % roztoku dextranu 40 000 jsme přidali příslušné množství polyethylenglykolu 300 a promíchali.

4.3.6 Roztok dextranu se sojovým lecithinem

Složení:

Zředěný roztok dextranu 40 000	5,0 g
Lecithin sojový	50 μ l

Postup: Asi 1 g lecithinu jsme vyjmuli z mrazícího zařízení, přenesli do skleněné vialky, ponechali 15 minut při pokojové teplotě, pak opatrně roztavili na vodní lázni při teplotě asi 40°C. Odpovídající množství natáhli do mikropipety a přidali k 0,1% roztoku dextranu 40 000.

4.3.7 Sublingvální membrány

Používali jsme sublingvální membrány z vepřových jazyků, získané z místního masokombinátu. Jazyky nesměly být poškozeny, mechanicky ani tepelně.

Jazyky jsme zbavili svaloviny a následně separovali tak, abychom získali téměř čistou sublingvální membránu tak, aby byla průsvitná, beze stop svalové tkáně.

Takto připravené membrány jsme vložili do fosforečnanového pufru o pH 7,4 s přídavkem azidu sodného.

Membrány pro pozdější využití byly pečlivě osušeny, zataveny do folie a zmrazeny.

4.3.8 Difúzní cela

Pro permeaci látek sublinguální membránou jsme používali modifikované Franzovy difúzní cely. Jedná se skleněné nádobky, které se skládají z horní donorové části a spodní akceptorové části, mezi něž se vkládají dvě destičky s kruhovými průřezy uprostřed, jež představují permeační komůrku – plocha 2 cm².

Ve spodní části cely jsme jako akceptorovou fázi použili pufr o pH 7,4 a umístili do ní míchadélko, které zajišťovalo neustálé promíchávání akceptorové fáze. Do horní části – donorové jsme vpravili pomocí pipety roztok kofeinu nebo zkoušené roztoky dextranů a prostor zakryli hodinovým sklíčkem, aby nedocházelo k odpařování vody z této fáze. Celou sestavu jsme temperovali na 37°C.

Ve stanovených časových intervalech jsme odebírali 0,6 ml vzorků akceptorové fáze a zároveň ji pufrem doplňovali. Tyto vzorky jsme ve vialkách dávali do lednice a následně měřili pomocí HPLC (na katedře farmaceutické technologie) nebo pomocí fluorescenční spektrometrie (na katedře fyzikální chemie).

4.3.9 Permeační standardizace sublingválních membrán

Pro měření permeační neporušenosti jsme použili jako standardu roztok kofeinu. Z dřívějších experimentů na katedře se totiž ukázalo, že kofein je látka, která dobře prochází přes biologické membrány a dobře stanovitelná pomocí HPLC.

Pro standardizační měření permeability membrán jsme použili 4 % roztok kofeinu. Pomocí pipety jsme vpravili množství 0,5 ml roztoku do donorové části, a injekční jehlou necelých 20 ml fosfátového pufru do akceptorové části. Přesné objemy akceptorové části jsme si dopočítali ze zbylého množství pufru v injekční stříkačce. Jednotlivé vzorky jsme odebírali každou hodinu do vialek dle **Tab. 4.1** a po čtyřech hodinách jsme permeaci ukončili. V odebraných vzorcích jsme následně provedli stanovení kofeinu.

Tab. 4.1 Časové intervaly odběrů vzorků ke stanovení kofeinu

Číslo odběru	Čas	Čas. interval od nasazení
1.	9:30 h	1 h
2.	10:30 h	2 h
3.	11:30 h	3 h
4.	12:30 h	4 h

K experimentu jsme použili sublingvální membrány různého stáří, konkrétně ze dne 5.5.2010 a 30.3.2010. Jejich rozložení v pokusu je patrné z tabulky **Tab. 4.2**.

Tab. 4.2 Rozložení membrán různého stáří do jednotlivých difúzních cel

Datum separace membrány	Číslo permeačních buněk
5.5.2010	1, 2, 3 7, 8, 9 13, 14, 15
30.3.2010	4, 5, 6 10, 11, 12 16, 17, 18

4.3.10 HPLC stanovení kofeinu

Měření jsme prováděli na HPLC popsaném v části **Přístroje**. Jako mobilní fáze byla použita směs 25 % methanolu a 75 % vody pro HPLC s přídavkem 0,2 % roztoku kyseliny mravenčí.

Pro stanovení množství kofeinů v našich vzorcích bylo třeba vytvořit kalibrační křivku, ze které byla daná množství odečítána. Vyšli jsme z koncentrací kofeinu 1mg/100ml, 10mg/100ml, 25mg/100ml, 50mg/100ml a 100mg/100ml. Po proměření kalibračních roztoků byla na základě lineární regrese vytvořena kalibrační přímka a využita pro stanovení kofeinu v akceptorové fázi z permeačních pokusů.

4.3.11 Fluorimetrické stanovení dextranu 40 000

K měření se používali fluorescenčně značené dextrany, jejich koncentrace jsme měřili pomocí fluorescenční spektrofotometrie. Nejprve jsme sestrojili kalibrační křivku, ke které jsme vztahovali neznámé vzorky. Zvolili jsme 0,002 %, 0,004 %, 0,006 %, 0,008 %, 0,01 % koncentrace kalibračních roztoků, které odpovídají koncentracím 2mg/100ml, 4mg/100ml, 6mg/100ml, 8mg/100ml a 10mg/100ml dextranu 40 000 ve vodě.

Při měření jsme používali jednocentimetrovou křemíkovou kyvetu, kterou jsme vyplachovali jak čistou vodou, tak ethanolem.

4.3.12 Zpracování dat z permeačních pokusů

Výsledky z permeačních pokusů byly získány převedením dat vygenerovaných softwarem ChemStation chromatografu Agilent 1200 do programové aplikace v Excelu a jejich následným zpracováním pomocí speciální šablony pro hodnocení permeací, která je v laboratoři katedry farmaceutické technologie k dispozici.

Zpracování dat z ChemStation k převedení do permeační šablony prováděli Mgr. Pavel Berka a Mgr. Petr Vrbata (katedra farmaceutické technologie).

Se spektrofluorimetrickým měřením nám technicky pomohl Ing. Vladimír Kubíček, CSc. (katedra biofyziky a fyzikální chemie).

V kapitole **5. Dokumenty** jsou v podobě protokolů shrnuty informace z jednotlivých dílčích permeačních měření na 18 sublingválních membránách.

Získané hodnoty z měření HPLC odpovídají nekorigovaným koncentracím c_{nk} . Pomocí počítačového programu byly tyto hodnoty převedeny na korigovanou koncentraci c_k , která zohledňuje průběžný odběr vzorků, doplňování akceptorové fáze i její objem na počátku pokusu V_0 . Následně jsme získali hodnoty Q_t (množství kofeinu, který se uvolnil z membrány do akceptorové fáze) a $Q_{t(teor)}$, což je množství vztažené na jednotku plochy. Výsledkem bylo grafické vyjádření průběhu permeace a získání hodnot fluxu J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] kofeinu, které byly následně porovnávány s fluxem dextranu 40 000.

4.3.13 Vysvětlivky k protokolům

c_{nk} = nekorigovaná koncentrace

c_n = korigovaná koncentrace, zohledňuje průběžný odběr a doplňování akceptorové fáze

$Q_t = Q_{t(exp)}$ [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] = skutečné množství látky, které se uvolní membránou o ploše 1cm^2 do akceptorové fáze

Q_t [μg] = skutečné množství látky, které se uvolní membránou do akceptorové fáze

$Q_{t(teor)}$ [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$] = množství látky, které se uvolní membránou o ploše 1cm^2 do akceptorové fáze a odečtené z regresní křivky

5 DOKUMENTACE

Protokol 1

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19,7$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

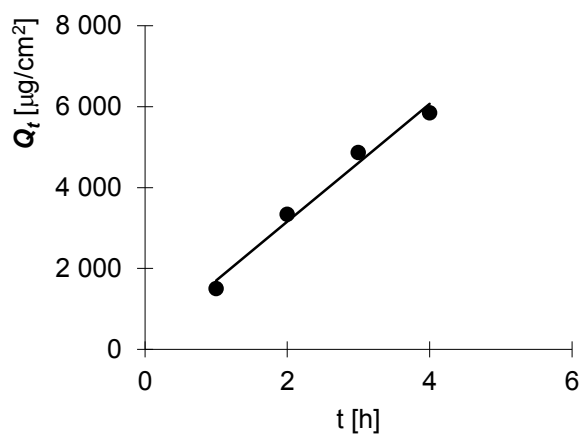
Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	15,242	0,6	15,242	3 002,6	1 501,3
2	33,390	0,6	33,854	6 669,3	3 334,7
3	48,354	0,6	49,386	9 729,0	4 864,5
4	57,811	0,6	59,315	11 685,1	5 842,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	1501,3	1702,7
2	3334,7	3158,1
3	4864,5	4613,4
4	5842,6	6068,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 1455,4$
Abs. člen	$q = 247,3$
Korelační koef.	$r = 0,9913$



Protokol 2

V_o	[ml]
T	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19,7$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

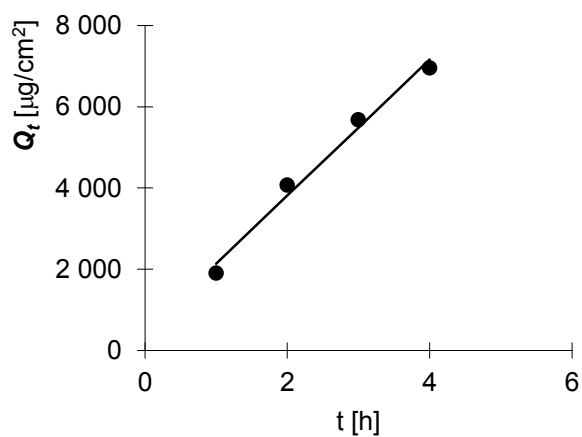
Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	19,282	0,6	19,282	3 798,6	1 899,3
2	40,751	0,6	41,339	8 143,7	4 071,8
3	56,375	0,6	57,634	11 353,9	5 676,9
4	68,811	0,6	70,567	13 901,7	6 950,8

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	1899,3	2135,8
2	4071,8	3811,7
3	5676,9	5487,7
4	6950,8	7163,7

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 1675,9
Abs. člen	q = 459,8
Korelační koef.	r = 0,9927



Protokol 3

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19,2$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

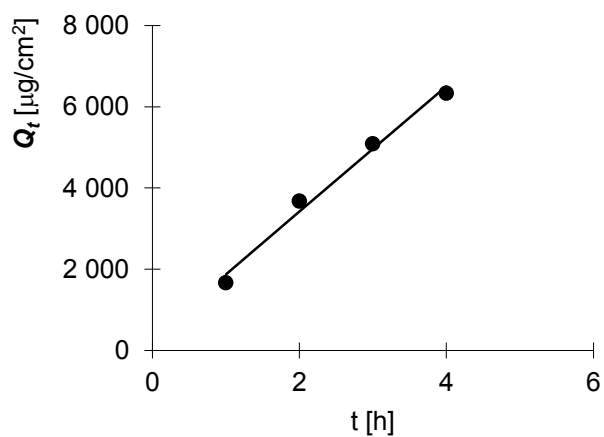
Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	17,349	0,6	17,349	3 331,1	1 665,5
2	37,726	0,6	38,269	7 347,6	3 673,8
3	51,825	0,6	53,021	10 179,9	5 090,0
4	64,326	0,6	65,983	12 668,6	6 334,3

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	1665,5	1877,5
2	3673,8	3419,8
3	5090,0	4962,0
4	6334,3	6504,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 1542,3
Abs. člen	q = 335,3
Korelační koef.	r = 0,9935



Protokol 4

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,9$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

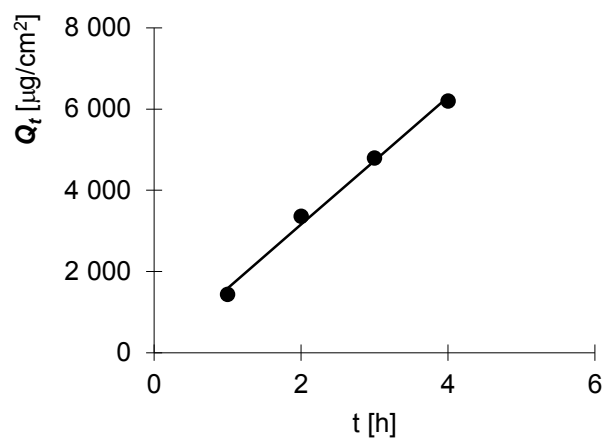
Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	15,115	0,6	15,115	2 856,7	1 428,4
2	35,021	0,6	35,500	6 709,6	3 354,8
3	49,534	0,6	50,661	9 574,9	4 787,4
4	63,910	0,6	65,518	12 382,9	6 191,5

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	1428,4	1582,2
2	3354,8	3154,4
3	4787,4	4726,6
4	6191,5	6298,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 1572,2
Abs. člen	q = 10,03
Korelační koef.	r = 0,9968



Protokol 5

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,3$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

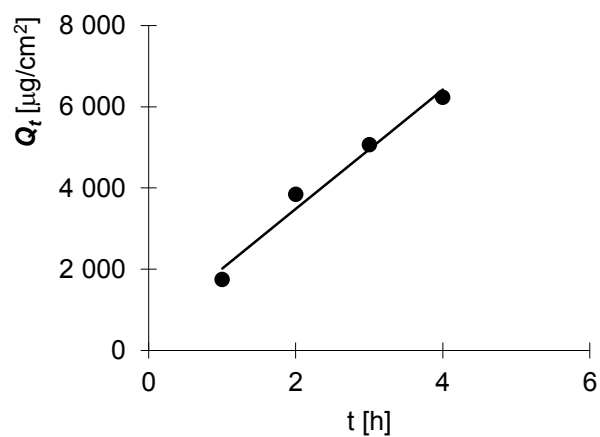
Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	20,151	0,6	20,151	3 486,1	1 743,0
2	43,687	0,6	44,386	7 678,7	3 839,3
3	56,968	0,6	58,507	10 121,7	5 060,9
4	69,996	0,6	72,026	12 460,4	6 230,2

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	1743,0	2015,9
2	3839,3	3484,2
3	5060,9	4952,5
4	6230,2	6420,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 1468,3$
Abs. člen	$q = 547,6$
Korelační koef.	$r = 0,9887$



Protokol 6

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,1$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

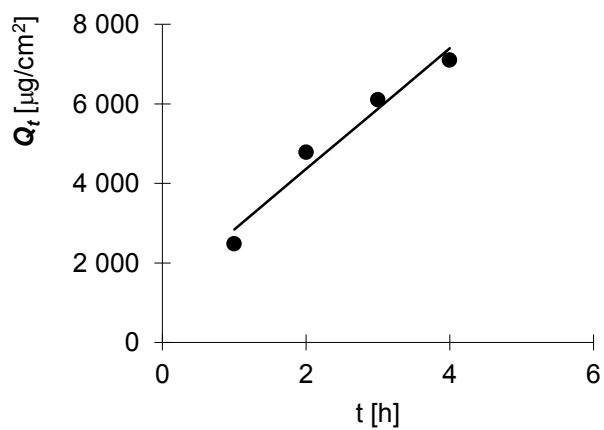
Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	27,461	0,6	27,461	4 970,4	2 485,2
2	51,989	0,6	52,899	9 574,7	4 787,4
3	65,725	0,6	67,479	12 213,7	6 106,9
4	76,278	0,6	78,515	14 211,2	7 105,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	2485,2	2844,2
2	4787,4	4362,2
3	6106,9	5880,3
4	7105,6	7398,4

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 1518,1$
Abs. člen	$q = 1326,1$
Korelační koef.	$r = 0,9812$



Protokol 7

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

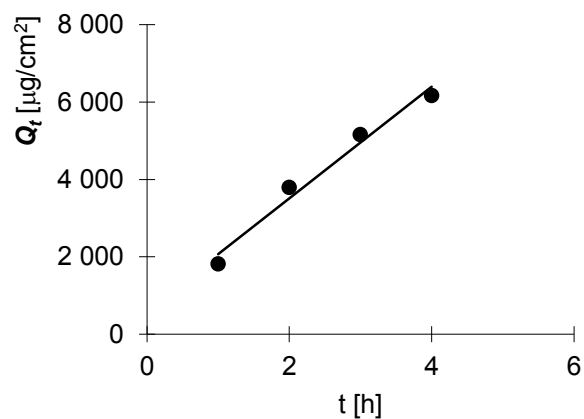
Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	21,329	0,6	21,329	3 625,9	1 812,9
2	43,901	0,6	44,654	7 591,2	3 795,6
3	59,076	0,6	60,652	10 310,8	5 155,4
4	70,412	0,6	72,553	12 333,9	6 167,0

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	1812,9	2069,5
2	3795,6	3511,6
3	5155,4	4953,8
4	6167,0	6396,0

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 1442,2
Abs. člen	q = 627,3
Korelační koef.	r = 0,9887



Protokol 8

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19,4$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

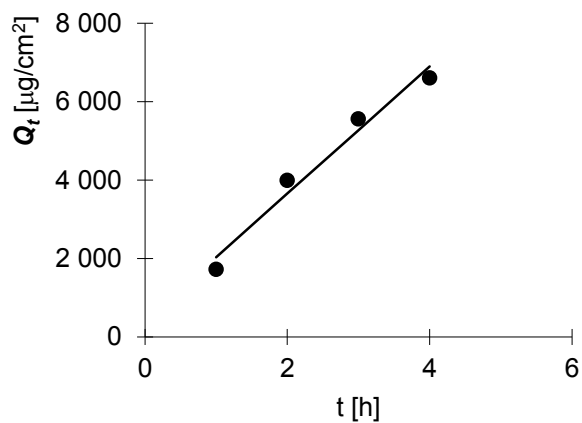
Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	17,766	0,6	17,766	3 446,6	1 723,3
2	40,544	0,6	41,094	7 972,2	3 986,1
3	56,011	0,6	57,282	11 112,6	5 556,3
4	66,281	0,6	68,052	13 202,2	6 601,1

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	1723,3	2036,2
2	3986,1	3656,5
3	5556,3	5276,9
4	6601,1	6897,2

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 1620,4$
Abs. člen	$q = 415,8$
Korelační koef.	$r = 0,9861$



Protokol 9

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19,4$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

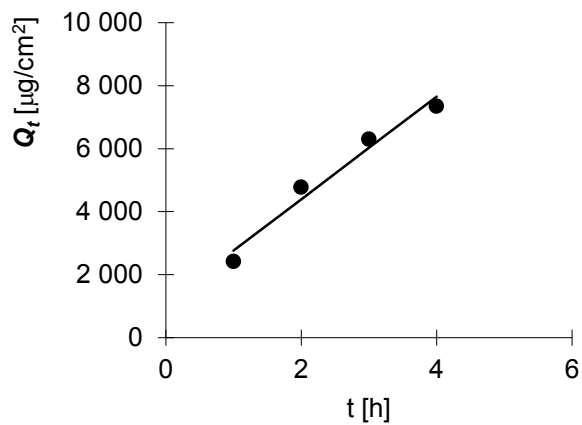
Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	24,884	0,6	24,884	4 827,5	2 413,7
2	48,442	0,6	49,212	9 547,1	4 773,6
3	63,389	0,6	64,911	12 592,6	6 296,3
4	73,666	0,6	75,674	14 680,7	7 340,3

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	2413,7	2760,6
2	4773,6	4390,9
3	6296,3	6021,1
4	7340,3	7651,4

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 1630,3
Abs. člen	q = 1130,4
Korelační koef.	r = 0,9839



Protokol 10

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,1$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

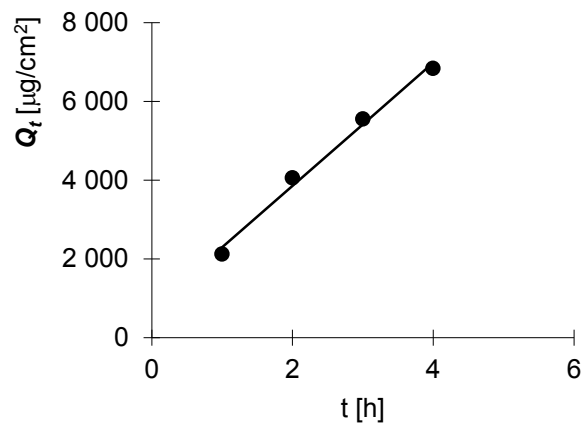
Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	24,775	0,6	24,775	4 236,6	2 118,3
2	46,507	0,6	47,376	8 101,4	4 050,7
3	63,204	0,6	64,866	11 092,1	5 546,0
4	77,614	0,6	79,890	13 661,1	6 830,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	2118,3	2291,6
2	4050,7	3854,8
3	5546,0	5418,0
4	6830,6	6981,2

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 1563,2$
Abs. člen	$q = 728,3$
Korelační koef.	$r = 0,9956$



Protokol 11

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,3$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

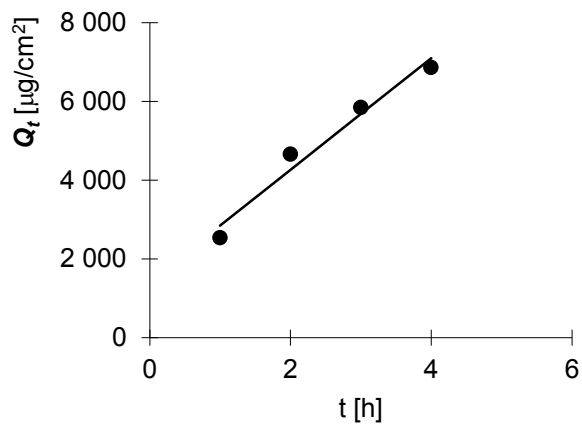
Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	29,311	0,6	29,311	5 070,8	2 535,4
2	52,772	0,6	53,789	9 305,4	4 652,7
3	65,630	0,6	67,495	11 676,7	5 838,3
4	76,946	0,6	79,287	13 716,6	6 858,3

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	2535,4	2848,1
2	4652,7	4263,5
3	5838,3	5678,9
4	6858,3	7094,3

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 1415,4$
Abs. člen	$q = 1432,6$
Korelační koef.	$r = 0,9839$



Protokol 12

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

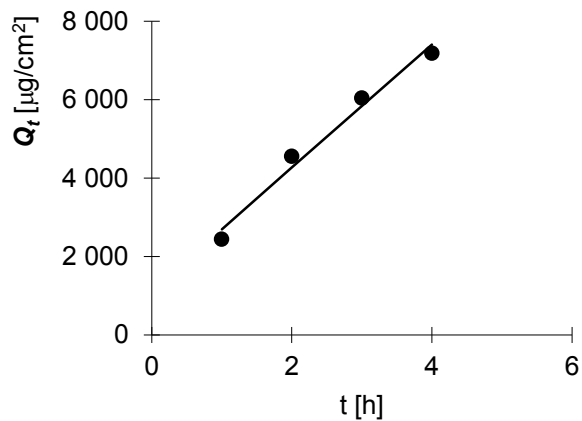
Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	27,122	0,6	27,122	4 882,0	2 441,0
2	49,687	0,6	50,591	9 106,4	4 553,2
3	65,393	0,6	67,079	12 074,3	6 037,1
4	77,561	0,6	79,797	14 363,5	7 181,8

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	2441,0	2697,3
2	4553,2	4268,0
3	6037,1	5838,6
4	7181,8	7409,2

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 1570,6$
Abs. člen	$q = 1126,7$
Korelační koef.	$r = 0,9905$



Protokol 13

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,9$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

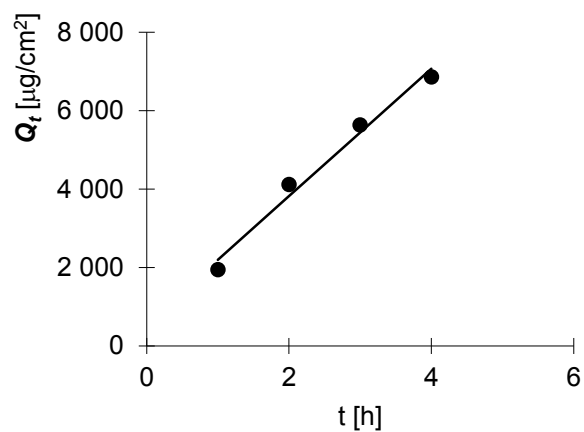
Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	20,512	0,6	20,512	3 876,8	1 938,4
2	42,887	0,6	43,538	8 228,7	4 114,4
3	58,168	0,6	59,551	11 255,0	5 627,5
4	70,615	0,6	72,506	13 703,6	6 851,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	1938,4	2195,0
2	4114,4	3820,4
3	5627,5	5445,7
4	6851,8	7071,0

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 1625,3$
Abs. člen	$q = 569,7$
Korelační koef.	$r = 0,9913$



Protokol 14

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,5$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

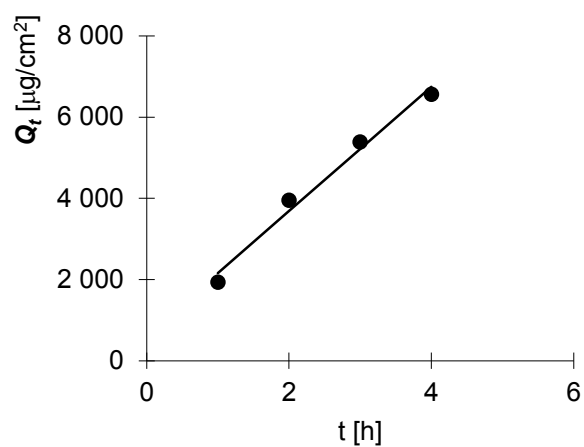
Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	20,825	0,6	20,825	3 852,7	1 926,3
2	41,939	0,6	42,615	7 883,7	3 941,9
3	56,748	0,6	58,130	10 754,1	5 377,0
4	68,911	0,6	70,796	13 097,3	6 548,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	1926,3	2153,2
2	3941,9	3683,4
3	5377,0	5213,6
4	6548,7	6743,8

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 1530,2$
Abs. člen	$q = 622,9$
Korelační koef.	$r = 0,9923$



Protokol 15

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,1$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

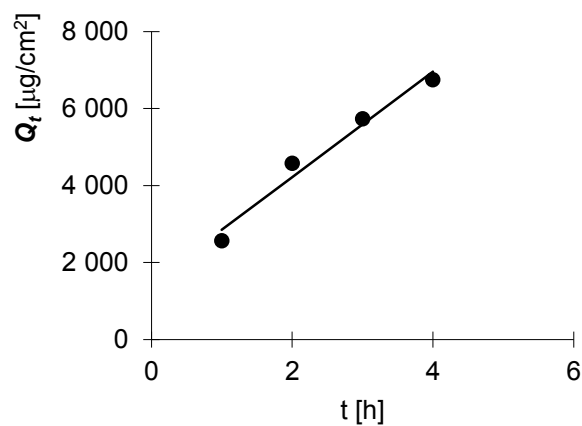
Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	29,962	0,6	29,962	5 123,6	2 561,8
2	52,430	0,6	53,481	9 145,3	4 572,6
3	65,112	0,6	66,989	11 455,1	5 727,5
4	76,519	0,6	78,870	13 486,7	6 743,3

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	2561,8	2846,4
2	4572,6	4216,4
3	5727,5	5586,3
4	6743,3	6956,3

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 1369,9$
Abs. člen	$q = 1476,4$
Korelační koef.	$r = 0,9858$



Protokol 16

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,8$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

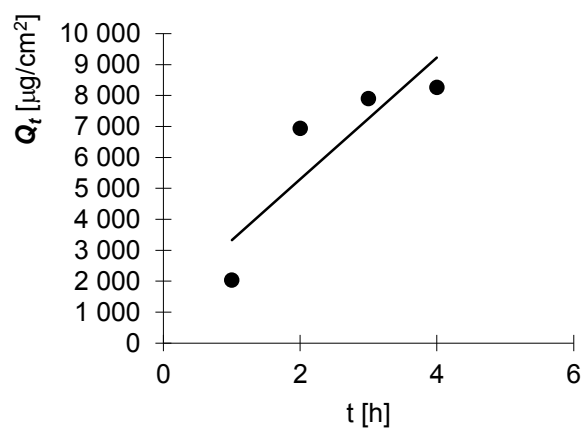
Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	21,615	0,6	21,615	4 063,7	2 031,9
2	73,050	0,6	73,740	13 863,1	6 931,5
3	81,635	0,6	83,989	15 789,8	7 894,9
4	85,183	0,6	87,863	16 518,2	8 259,1

t	Q_t (exp)	Q_t (teor)
1	2031,9	3332,6
2	6931,5	5297,1
3	7894,9	7261,6
4	8259,1	9226,1

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 1964,5$
Abs. člen	$q = 1368,1$
Korelační koef.	$r = 0,8786$



Protokol 17

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

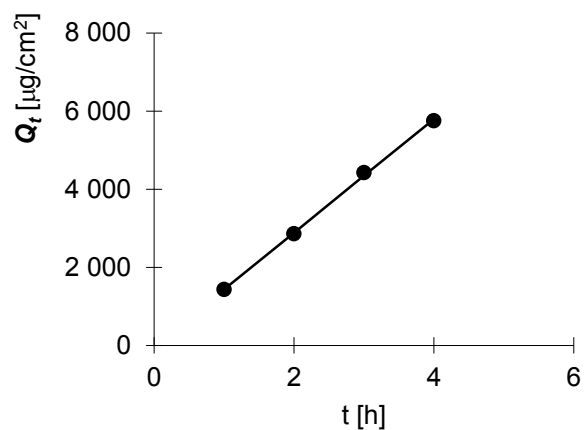
Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	15,002	0,6	15,002	2 850,4	1 425,2
2	29,590	0,6	30,064	5 712,2	2 856,1
3	45,617	0,6	46,566	8 847,6	4 423,8
4	59,034	0,6	60,505	11 495,9	5 747,9

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	1425,2	1432,9
2	2856,1	2886,5
3	4423,8	4340,0
4	5747,9	5793,6

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 1453,6$
Abs. člen	$q = 20,7$
Korelační koef.	$r = 0,9995$



Protokol 18

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19,2$

Subling. membrána

Donor: 4Kof

Měření: $\lambda = 282\text{nm}$

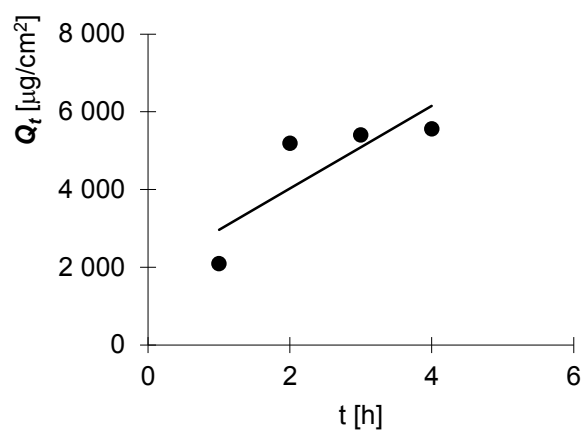
Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
1	21,770	0,6	21,770	4 179,8	2 089,9
2	53,350	0,6	54,030	10 373,8	5 186,9
3	54,574	0,6	56,262	10 802,3	5 401,1
4	56,119	0,6	57,877	11 112,4	5 556,2

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
1	2089,9	2966,6
2	5186,9	4027,9
3	5401,1	5089,2
4	5556,2	6150,5

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 1061,3$
Abs. člen	$q = 1905,2$
Korelační koef.	$r = 0,8290$



Protokol 19

V_o	[ml]
T	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,7$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40

Měření: ExEm: 419/529

Plocha

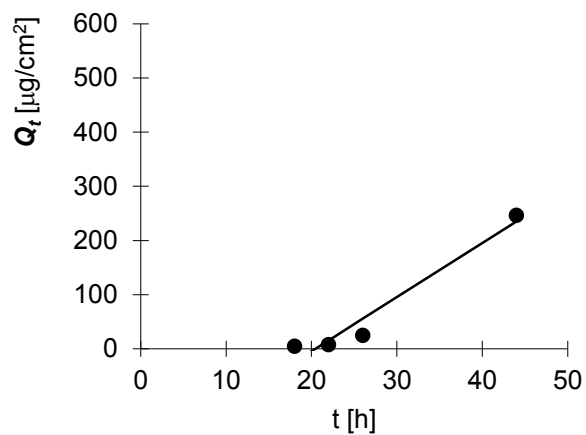
2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	-0,031	0,6	-0,031	-5,8	-2,9
8	-0,027	0,6	-0,028	-5,3	-2,6
18	0,046	0,6	0,045	8,4	4,2
22	0,077	0,6	0,078	14,6	7,3
26	0,257	0,6	0,259	48,5	24,2
44	2,624	0	2,632	492,2	246,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	4,2	-24,4
22	7,3	15,5
26	24,2	55,5
44	246,1	235,2

Parametry regrese

Počet bodů	n = 4
Flux	J = 9,98
Abs. člen	q = -204,1
Korelační koef.	r = 0,9758



Protokol 20

V_o	[ml]
T	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,9$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40

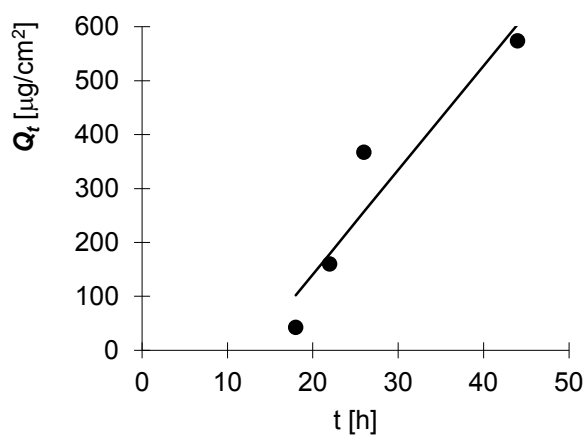
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	-0,031	0,6	-0,031	-5,9	-2,9
8	-0,020	0,6	-0,021	-3,9	-2,0
18	0,451	0,6	0,450	85,1	42,5
22	1,675	0,6	1,689	319,3	159,7
26	3,831	0,6	3,884	734,2	367,1
44	5,951	0	6,075	1 148,1	574,1

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	42,5	102,1
22	159,7	179,5
26	367,1	256,8
44	574,1	604,9

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 19,3
Abs. člen	q = -246,0
Korelační koef.	r = 0,9468



Protokol 21

V_o	[ml]
T	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,4$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40

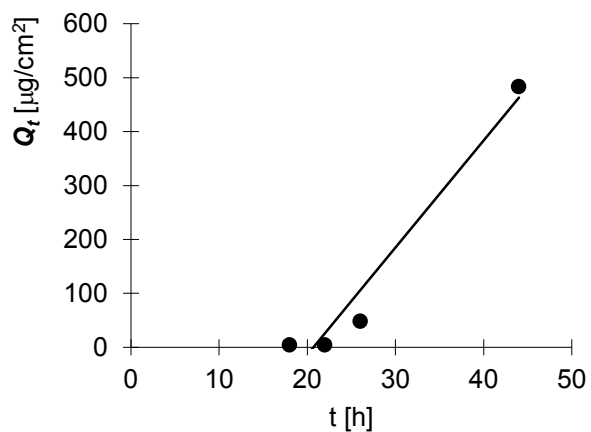
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	-0,022	0,6	-0,022	-4,0	-2,0
8	-0,010	0,6	-0,011	-2,0	-1,0
18	0,050	0,6	0,049	9,0	4,5
22	0,046	0,6	0,048	8,7	4,4
26	0,524	0,6	0,526	96,7	48,3
44	5,241	0	5,258	967,5	483,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	4,5	-53,4
22	4,4	26,1
26	48,3	105,5
44	483,8	462,8

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 19,9
Abs. člen	q = -410,7
Korelační koef.	r = 0,9767



V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,6$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40

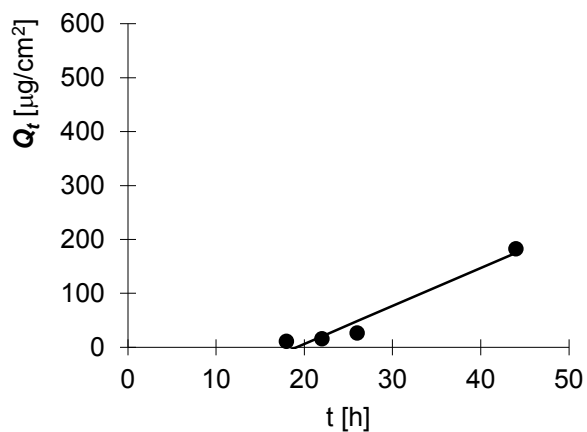
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	-0,016	0,6	-0,016	-3,0	-1,5
8	0,003	0,6	0,002	0,4	0,2
18	0,116	0,6	0,116	21,6	10,8
22	0,166	0,6	0,170	31,6	15,8
26	0,277	0,6	0,282	52,5	26,3
44	1,956	0	1,965	365,4	182,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	10,8	-8,1
22	15,8	20,1
26	26,3	48,3
44	182,7	175,3

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 7,1$
Abs. člen	$q = -135,1$
Korelační koef.	$r = 0,9774$



V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40

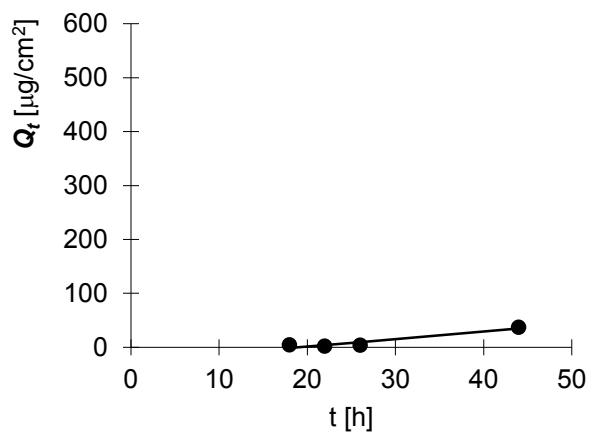
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	-0,003	0,6	-0,003	-0,5	-0,2
8	0,012	0,6	0,012	2,0	1,0
18	0,048	0,6	0,048	8,2	4,1
22	0,020	0,6	0,021	3,6	1,8
26	0,046	0,6	0,047	8,0	4,0
44	0,431	0	0,432	73,5	36,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	4,1	-1,6
22	1,8	4,0
26	4,0	9,6
44	36,7	34,7

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 1,4$
Abs. člen	$q = -26,7$
Korelační koef.	$r = 0,9562$



Protokol 24

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,4$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40

Měření: ExEm: 419/529

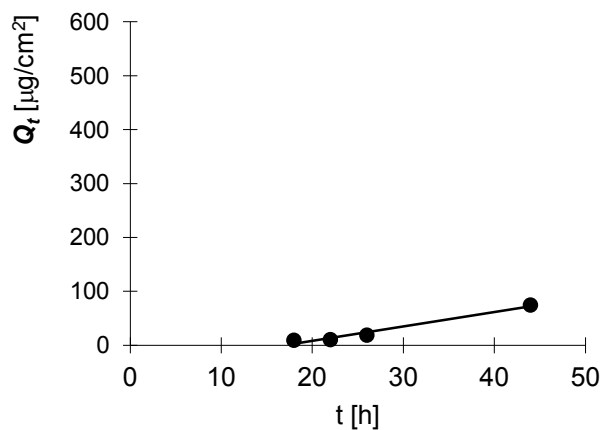
Plocha

2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	-0,024	0,6	-0,024	-3,9	-1,9
8	0,001	0,6	0,000	0,0	0,0
18	0,108	0,6	0,108	17,7	8,8
22	0,123	0,6	0,127	20,8	10,4
26	0,218	0,6	0,223	36,6	18,3
44	0,898	0	0,906	148,6	74,3

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	8,8	2,5
22	10,4	13,2
26	18,3	23,9
44	74,3	72,1

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 2,7$
Abs. člen	$q = -45,6$
Korelační koef.	$r = 0,9854$



V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 16,7$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40+PEG

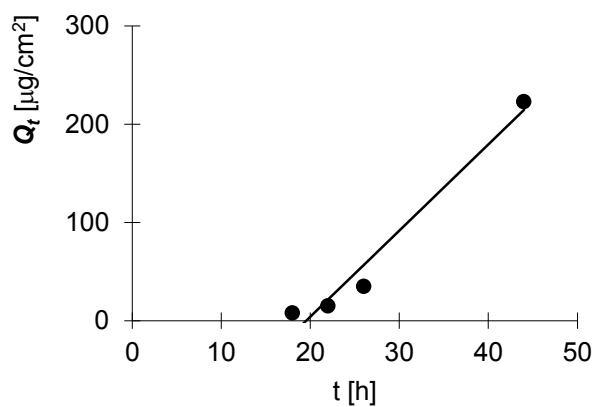
Měření: ExEm:419/529

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	-0,029	0,6	-0,029	-4,9	-2,4
8	-0,014	0,6	-0,015	-2,5	-1,3
18	0,091	0,6	0,091	15,1	7,6
22	0,173	0,6	0,176	29,5	14,7
26	0,409	0,6	0,415	69,4	34,7
44	2,651	0	2,666	445,3	222,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	7,6	-13,5
22	14,7	21,6
26	34,7	56,7
44	222,6	214,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 8,8$
Abs. člen	$q = -171,6$
Korelační koef.	$r = 0,9834$



Protokol 26

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 19$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40+PEG

Měření: ExEm:419/529

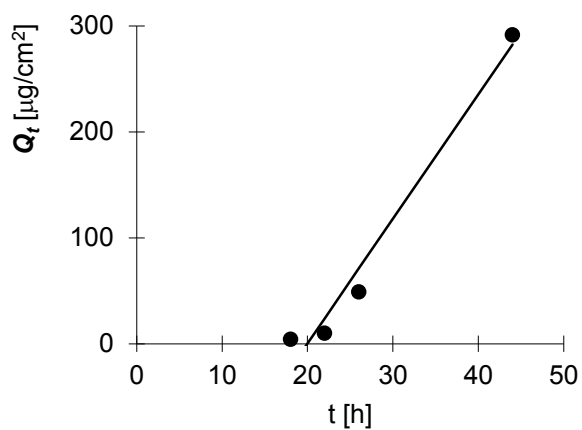
Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	-0,039	0,6	-0,039	-7,3	-3,7
8	-0,025	0,6	-0,027	-5,1	-2,5
18	0,042	0,6	0,041	7,9	3,9
22	0,102	0,6	0,103	19,6	9,8
26	0,510	0,6	0,513	97,4	48,7
44	3,051	0	3,067	582,8	291,4

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	3,9	-23,2
22	9,8	23,8
26	48,7	70,8
44	291,4	282,4

Parametry regrese

Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 11,8$
Abs. člen	$q = -234,8$
Korelační koef.	$r = 0,9865$



V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,5$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40+PEG

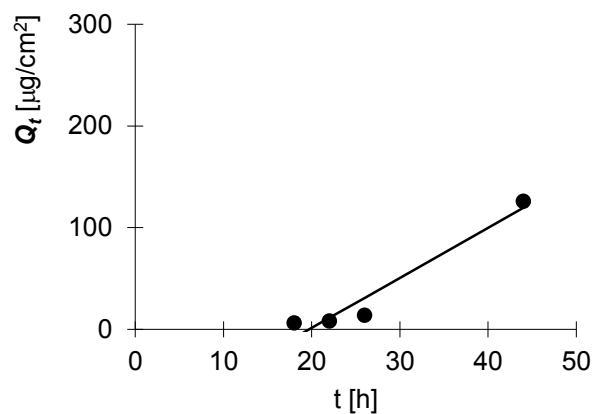
Měření: ExEm:419/529

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	-0,022	0,6	-0,022	-4,0	-2,0
8	-0,007	0,6	-0,007	-1,4	-0,7
18	0,068	0,6	0,068	12,6	6,3
22	0,085	0,6	0,088	16,2	8,1
26	0,145	0,6	0,148	27,4	13,7
44	1,353	0	1,358	251,2	125,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	6,3	-8,4
22	8,1	11,3
26	13,7	31,0
44	125,6	119,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 4,9$
Abs. člen	$q = -97,2$
Korelační koef.	$r = 0,9719$



V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40+PEG

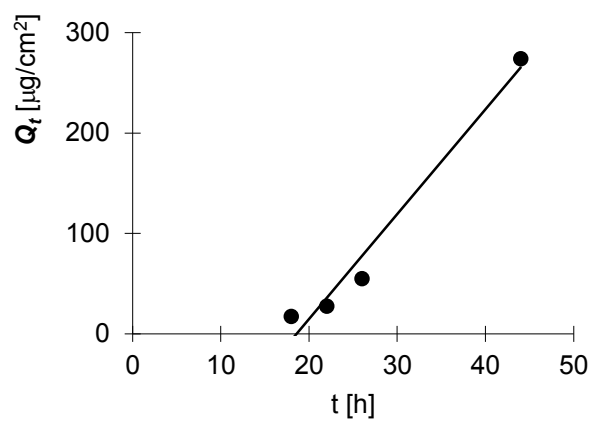
Měření: ExEm:419/529

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	-0,027	0,6	-0,027	-4,6	-2,3
8	0,005	0,6	0,004	0,6	0,3
18	0,200	0,6	0,200	34,0	17,0
22	0,315	0,6	0,322	54,7	27,4
26	0,630	0,6	0,642	109,1	54,5
44	3,197	0	3,219	547,3	273,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	17,0	-6,0
22	27,4	35,8
26	54,5	77,5
44	273,6	265,3

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 10,4$
Abs. člen	$q = -193,8$
Korelační koef.	$r = 0,9864$



V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 16,9$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40+PEG

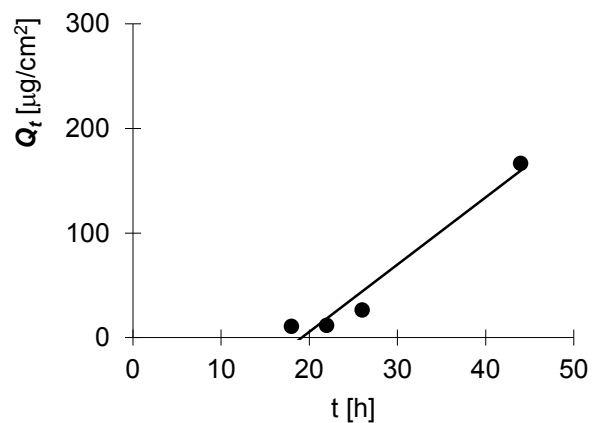
Měření: ExEm:419/529

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	0,016	0,6	0,016	2,7	1,3
8	0,034	0,6	0,035	5,9	3,0
18	0,125	0,6	0,126	21,3	10,7
22	0,132	0,6	0,137	23,1	11,6
26	0,306	0,6	0,311	52,5	26,2
44	1,957	0	1,968	332,6	166,3

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	10,7	-7,4
22	11,6	18,3
26	26,2	44,0
44	166,3	159,8

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 6,4$
Abs. člen	$q = -123,1$
Korelační koef.	$r = 0,9783$



V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 17,3$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40+PEG

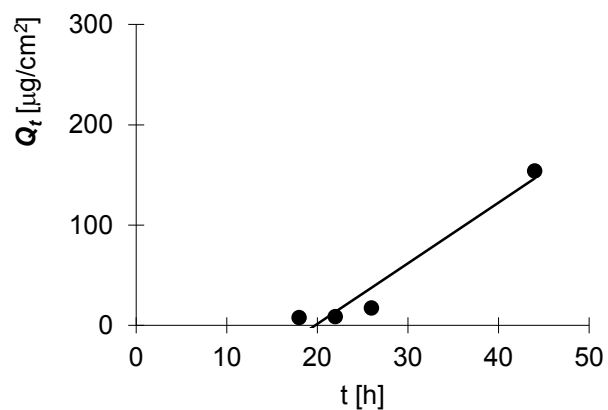
Měření: ExEm:419/529

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	-0,007	0,6	-0,007	-1,2	-0,6
8	0,008	0,6	0,008	1,4	0,7
18	0,089	0,6	0,089	15,4	7,7
22	0,095	0,6	0,098	16,9	8,4
26	0,193	0,6	0,196	34,0	17,0
44	1,770	0	1,777	307,4	153,7

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	7,7	-10,8
22	8,4	13,4
26	17,0	37,6
44	153,7	146,6

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 6,1
Abs. člen	q = -119,8
Korelační koef.	r = 0,9721



V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,4$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40+lec

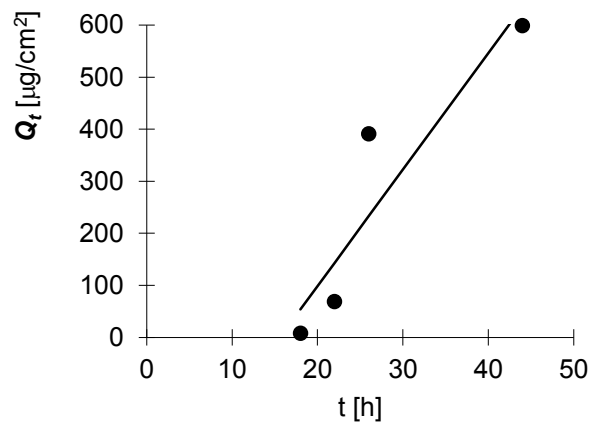
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	-0,033	0,6	-0,033	-6,1	-3,0
8	-0,022	0,6	-0,023	-4,2	-2,1
18	0,083	0,6	0,083	15,2	7,6
22	0,741	0,6	0,744	136,9	68,5
26	4,219	0,6	4,243	780,7	390,3
44	6,365	0	6,503	1 196,6	598,3

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	7,6	53,6
22	68,5	143,1
26	390,3	232,6
44	598,3	635,3

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 4
Flux	J = 22,4
Abs. člen	q = -349,1
Korelační koef.	r = 0,9238



V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,2$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40+lec

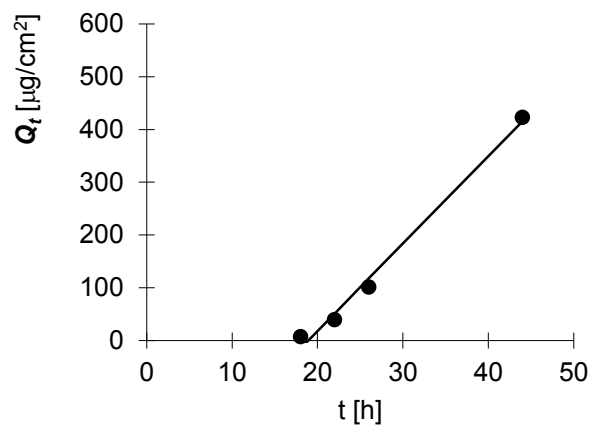
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	-0,031	0,6	-0,031	-5,6	-2,8
8	-0,014	0,6	-0,015	-2,8	-1,4
18	0,072	0,6	0,072	13,1	6,5
22	0,426	0,6	0,429	78,0	39,0
26	1,091	0,6	1,105	201,2	100,6
44	4,604	0	4,641	844,6	422,3

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	6,5	-15,2
22	39,0	51,0
26	100,6	117,3
44	422,3	415,3

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 16,6$
Abs. člen	$q = -313,2$
Korelační koef.	$r = 0,9957$



V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 17,1$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40+lec

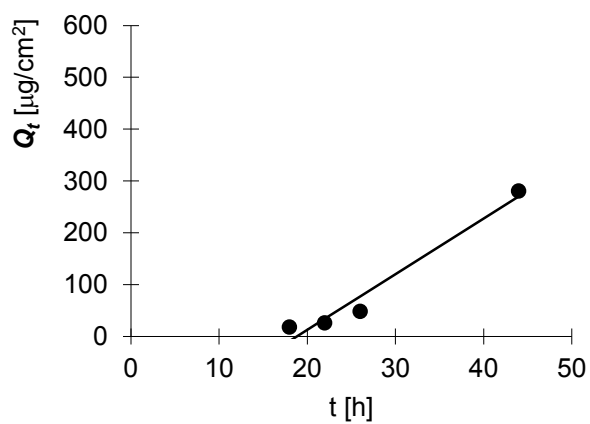
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	-0,007	0,6	-0,007	-1,1	-0,6
8	0,008	0,6	0,008	1,4	0,7
18	0,215	0,6	0,215	36,7	18,4
22	0,295	0,6	0,303	51,8	25,9
26	0,554	0,6	0,565	96,5	48,3
44	3,264	0	3,284	561,5	280,8

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	18,4	-8,7
22	25,9	34,2
26	48,3	77,2
44	280,8	270,6

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 10,7$
Abs. člen	$q = -202,1$
Korelační koef.	$r = 0,9814$



V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1\text{cm}^2$

$V_o = 18,8$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40+lec

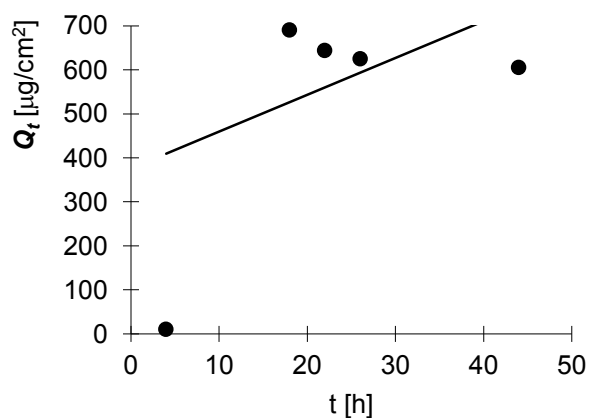
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	0,107	0,6	0,107	20,1	10,1
8	7,454	0,6	7,457	1 402,0	701,0
18	7,108	0,6	7,346	1 381,0	690,5
22	6,621	0,6	6,855	1 288,7	644,4
26	6,432	0,6	6,651	1 250,4	625,2
44	6,230	0	6,442	1 211,2	605,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
4	10,1	409,5
8	701,0	442,9
18	690,5	526,6
22	644,4	560,1
26	625,2	593,5
44	605,6	744,1

Parametry regrese	
Počet bodů	n = 6
Flux	J = 8,4
Abs. člen	q = 376,0
Korelační koef.	r = 0,4504



V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,4$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40+lec

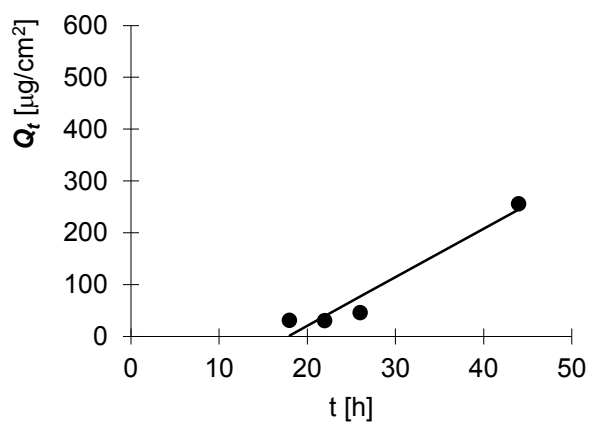
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	0,003	0,6	0,003	0,5	0,2
8	0,272	0,6	0,272	50,1	25,1
18	0,328	0,6	0,337	62,0	31,0
22	0,317	0,6	0,328	60,4	30,2
26	0,491	0,6	0,502	92,3	46,2
44	2,765	0	2,781	511,7	255,9

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	31,0	2,0
22	30,2	39,4
26	46,2	76,8
44	255,9	245,0

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 9,3469$
Abs. člen	$q = -166,2$
Korelační koef.	$r = 0,9725$



Protokol 36

V_o	[ml]
t	[h]
C_{nk}	[mg/100ml]
ΔV_{dop}	[ml]
C_k	[mg/100ml]
Q_t	[μ g] ve V_o
Q_t	[μ g] ve $V_o / 1cm^2$

$V_o = 18,9$

Subling. membrána

Donor: 0,1Dex40+lec

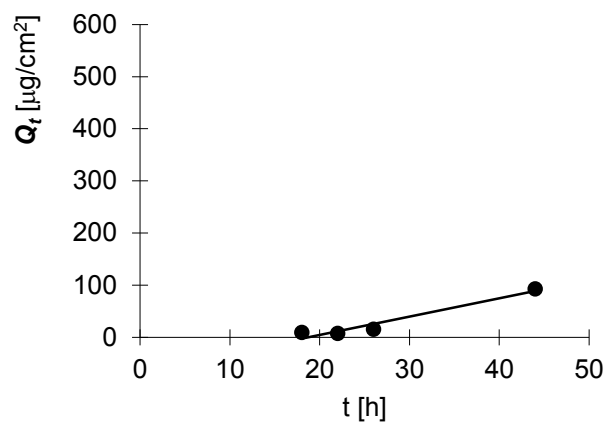
Měření: ExEm: 419/529

Plocha 2

t	C_{nk}	ΔV_{dop}	C_k	Q_t	Q_t
4	0,012	0,6	0,012	2,3	1,1
8	0,038	0,6	0,039	7,3	3,7
18	0,089	0,6	0,090	17,1	8,5
22	0,074	0,6	0,077	14,5	7,2
26	0,158	0,6	0,160	30,3	15,1
44	0,975	0	0,980	185,3	92,6

t	$Q_t (exp)$	$Q_t (teor)$
18	8,5	-2,4
22	7,2	11,6
26	15,1	25,6
44	92,6	88,7

Parametry regrese	
Počet bodů	$n = 4$
Flux	$J = 3,5$
Abs. člen	$q = -65,5$
Korelační koef.	$r = 0,9738$



6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 K permeaci kofeinu

Z příložených **protokolů 1 až 18** je patrné, že kofein byl pro hodnocení integrity membrán a odhad permeabilitního potenciálu sublingválních membrán zvolen správně. Ověřili jsme, že prochází poměrně záhy po aplikaci donorového roztoku na membránu. Protokoly zároveň ukazují, jak během 4 hodin rostly koncentrace kofeinu v akceptorové fázi a nakolik jsou si jednotlivé fluxy jako směrnice regresních přímek podobné.

Z hodnot uvedených v protokolech je tedy patrné, že i samotné membrány mají podobné permeační vlastnosti, a že jejich separace proběhla správně pro pokus a byly opravdu získány a použity kvalitní sublingvální řezy.

Za upozornění stojí pouze výsledky z **protokolu 16**, kde zřejmě došlo k problému, například v permeační membráně. Z hodnot množství uvolněné látky i v grafickém vyjádření vyčteme, že po první hodině došlo k prudkému nárůstu koncentrace látky v akceptorové fázi. Jedním z důvodů může být povolení a prohnutí membrány mezi sklíčky a tím zvětšení permeační plochy. Mohlo k němu dojít během manipulace s difúzní celou při odebírání vzorků.

Jedním z cílů bylo zjistit jaký vliv má doba uchování membrány na průchod látek, zda bude nějak významně ovlivněn. Ukázalo se, že minimálně v hodnoceném intervalu 6 týdnů nikoliv.

Kofein jako námi zvolený nízkomolekulární standardní permeant procházel přibližně obdobně u sublingválních membrán z 30.3.2010 i z membrán z 5.5.2010. Potvrzují to jak hodnoty Q_t , ale i grafické vyjádření a získané hodnoty fluxů J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$].

6.2 K permeaci dextranu 40 000

Další část měření probíhala s roztoky dextranu 40 000 (dextran FD40S). K tomuto účelu jsme se rozhodli použít 0,1 % roztok dextranu 40 000, dále 0,1 % roztok dextranu 40 000 s přidavkem polyethylenglykolu 300 a 0,1 % roztok dextranu 40 000

s přidavkem sojového lecitinu. Přesné složení těchto roztoků a postup přípravy je v části **Přístroje** a rozložení příslušných vzorků je patrné z tabulky **Tab. 6.1**.

Tab. 6.1 Rozložení membrán a donorových roztoků

Číslo cely	Typ roztoku dextranu	Membrána	Číslo cely	Typ roztoku dextranu	Membrána
1	0,1%	5. 5. 2010	4	0,1%	30. 3. 2010
2	0,1%	5. 5. 2010	5	0,1%	30. 3. 2010
3	0,1%	5. 5. 2010	6	0,1%	30. 3. 2010
7	0,1%+ PEG 300	5. 5. 2010	10	0,1%+ PEG 300	30. 3. 2010
8	0,1%+ PEG 300	5. 5. 2010	11	0,1%+ PEG 300	30. 3. 2010
9	0,1%+ PEG 300	5. 5. 2010	12	0,1%+ PEG 300	30. 3. 2010
13	0,1% + lecitin	5. 5. 2010	16	0,1% + lecitin	30. 3. 2010
14	0,1% + lecitin	5. 5. 2010	17	0,1% + lecitin	30. 3. 2010
15	0,1% + lecitin	5. 5. 2010	18	0,1% + lecitin	30. 3. 2010

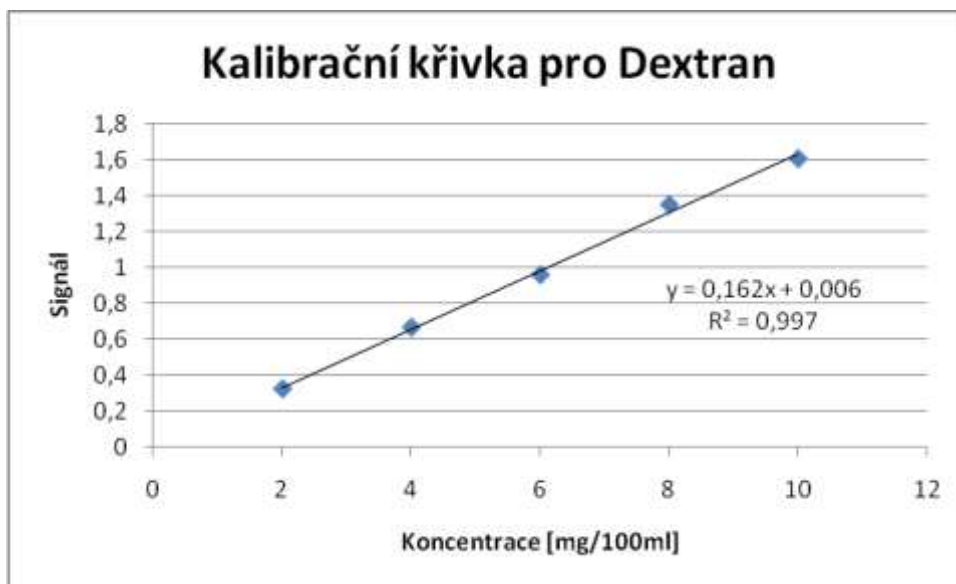
Po skončení standardizace jsme vyměnili akceptorovou a donorovou fázi. Během výměny jsme kontrolovali, jestli nedošlo k povolení membrány nebo jejímu viditelnému poškození. Membránu jsme vysušili buničitou vatou a poté opět upevnili mezi části difúzní cely. Aplikovali jsme jednotlivé donorové vzorky a stanovili si odběry akceptorových vzorků, jak uvádí **Tab. 6.2**.

Tab. 6.2 Časové intervaly odběrů vzorků z permeace dextranu

Číslo odběru	Reálný čas	Čas. interval
1.	17:30 h	4 h
2.	21:30 h	8 h
3.	7:30 h	18 h
4.	11:30 h	22 h
5.	15:30 h	26 h
6.	9:30 h	44 h

Kalibrační závislost pro dextran 40 000 zachycuje graf na **Obr. 6.1**, ve kterém jsou zároveň vyznačeny oba podstatné parametry z lineární regrese. Významné přitom je, že hodnota koeficientu determinace $R^2 = 0,9970$, což znamená, že danou závislost můžeme v celém potřebném rozsahu považovat za lineární.

Obr. 6.1 Kalibrační závislost emitance dextranu FD40S



Z fluorimetrického stanovení odebraných vzorků akceptorové fáze z permeačních pokusů jsme získali hodnoty vyjadřující nekorigované koncentrace c_{nk} dextranu FD40S, které jsme následně zpracovali s použitím vypracovaných šablon v programu Excel, který je upravil na korigované c_k a vypočetl z nich hodnoty Q_t a $Q_{t(teor)}$.

Při grafickém posuzování získaných závislostí jsme se soustředili na nalezení časového úseku lineárního vzestupu hodnot Q_t . Bylo to nutné proto, že zpočátku je nutné v principu předpokládat postupný průchod a nasycení membrány dextranem a v prvních hodinách pokusu tedy k nijak významnému průchodu této látky nedocházelo. Potřebovali jsme vyčíslit hodnotu fluxu dextranu FD40S a k tomu nalézt oblasti konstantního průtoku látky přes membránu, tzv. „steady state“.

Takto získané situace jsou znázorněny graficky ve všech protokolech v části **5. Dokumentace**. V tabulkách zmíněných protokolů jsou uvedeny všechny naměřené

hodnoty permeovaných kvant dextransu FD40S a v příslušných grafech potom pouze body, které byly brány v úvahu při výpočtu fluxů.

Ze všech grafů obsažených v **protokolech 19 až 36** je patrné, že k permeaci dextransu 40 000 docházelo vždy o několik hodin později, porovnáno s kofeinem aplikovaným na stejné membrány v první (standardizační) části experimentu. Je to nepochybně dáno tím, že molekula sledovaného dextransu je mnohonásobně větší, má složitější strukturu.

Hodnoty J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] fluxů dextransu 40 000 pro jednotlivé permeační buňky se pohybují v širokém intervalu. Ze získaných údajů jsme opět připravili jejich grafické vyjádření a následně jsme je porovnávali s hodnotami fluxů kofeinu.

Účelem bylo zjistit, jestli hodnoty fluxů z permeace dextransu alespoň částečně kopírují analogické hodnoty průchodu kofeinu na týchž jednotlivých membránách.

Z přiložených dvojic grafů na **Obr. 6.2 až 6.7** je patrné, že nikoliv. Soudíme, že toto konstatování není v této práci pro žádný z uvedených případů potřebné dokládat formálně statisticky. Za důležité konstatování je spíše potřebné říci, že hodnoty fluxů kofeinu dobře dokládají neporušenost sublingválních membrán. Jejich kolísání v rámci jednotlivých podskupin a vlastně i v celém souboru naměřených hodnot, odpovídá dlouhodobějším experimentálním zkušenostem pracoviště.

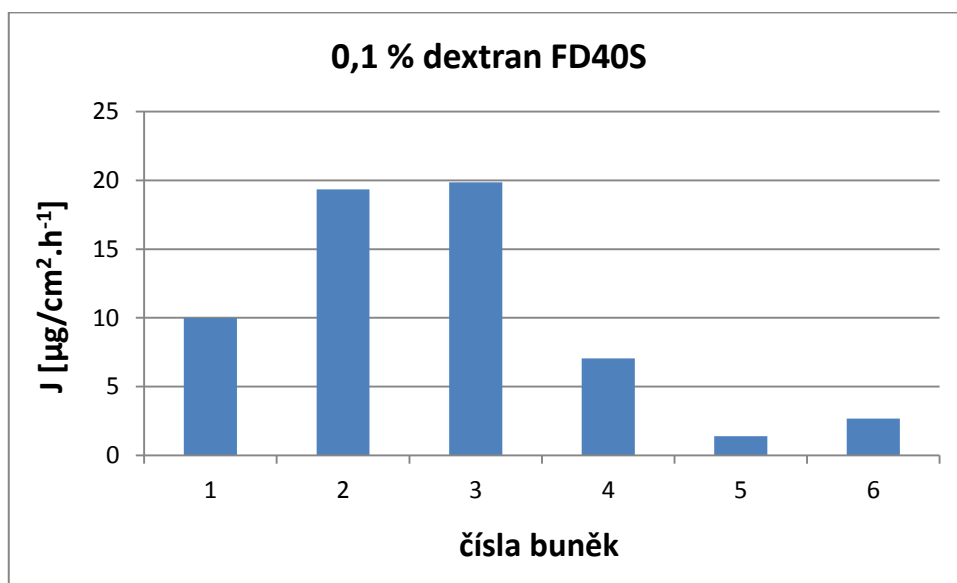
Dalším z úkolů práce bylo ověřit, zda přítomnost dvou vybraných pomocných látek používaných ve farmaceutické technologii pro úpravu vlastností tekutých aplikačních soustav neovlivní permeaci výšemolekulárního dextransu.

K získání odpovědi na tuto otázku jsme použili jednak 0,1 % roztok samotného dextransu FD40S, a tentýž roztok dextransu s přídavkem 20 % polyethylenglykolu 300, respektive

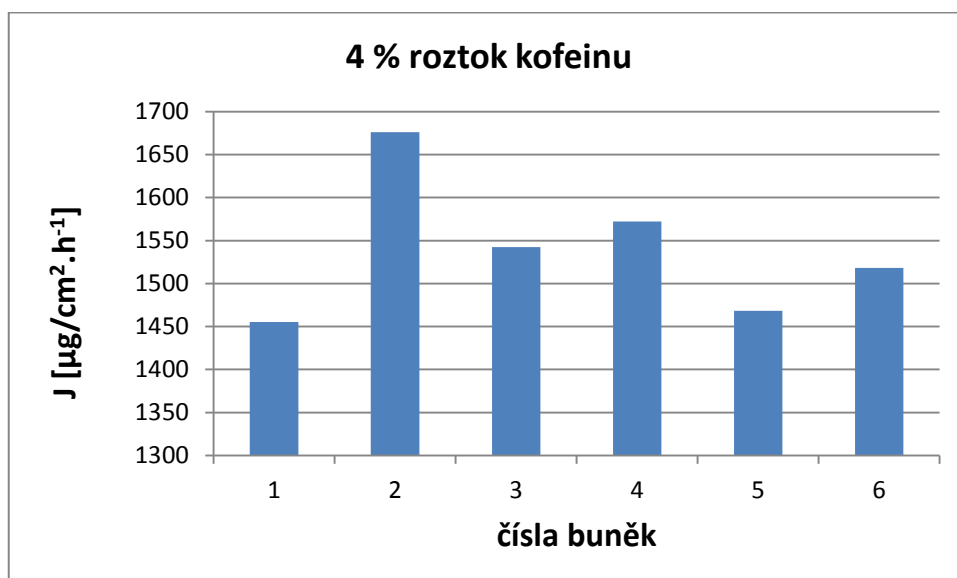
1 % přídavkem lecitinu. Jedná se o takové koncentrace zmíněných pomocných látek, které připadají běžně do úvahy při formulaci léčivých přípravků.

Měli jsme přitom na mysli jak interakce obou látek se sublingvální membránou, tak také zejména jejich interakce s molekulou dextransu.

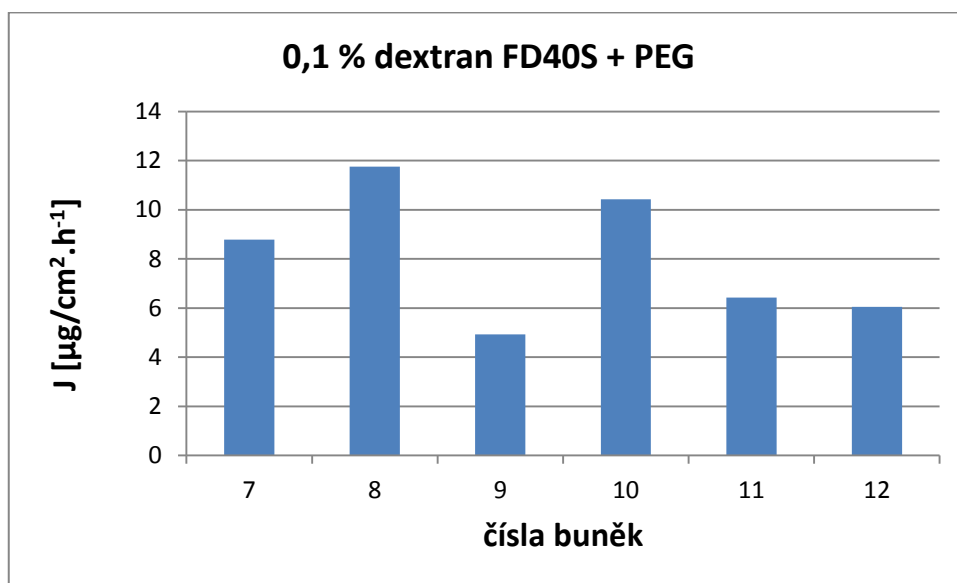
Obr. 6.2 Jednotlivé hodnoty fluxů FD40S z donorových vzorků 0,1 %



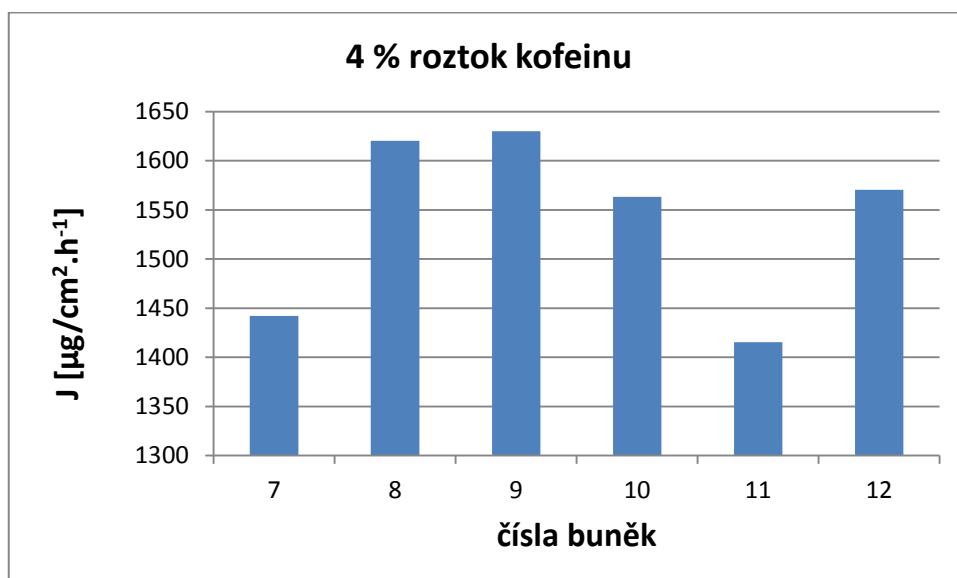
Obr. 6.3 Jednotlivé hodnoty fluxů kofeinu ze 4 % donorových vzorků



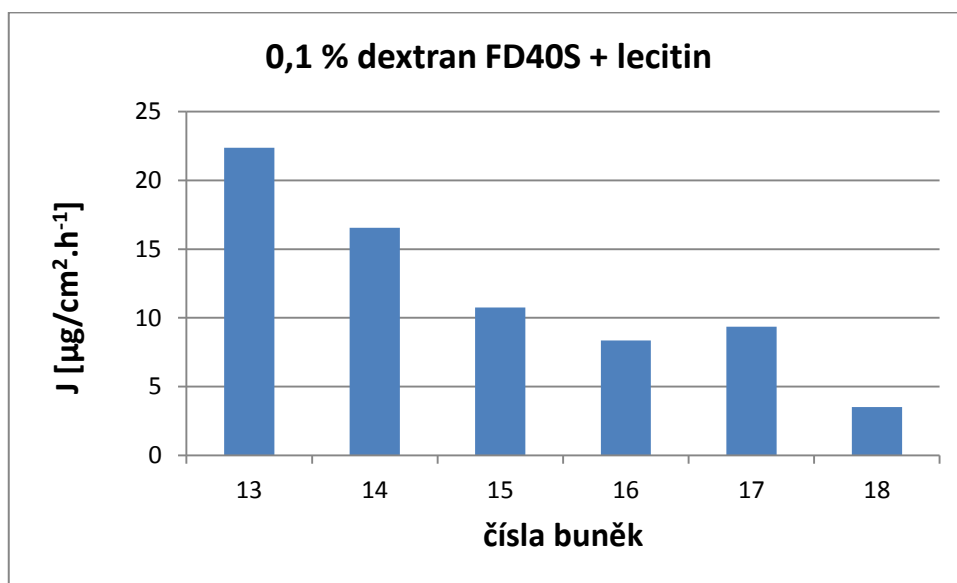
Obr. 6.4 Jednotlivé hodnoty fluxů FD40S z donorových vzorků 0,1 % + PEG 300



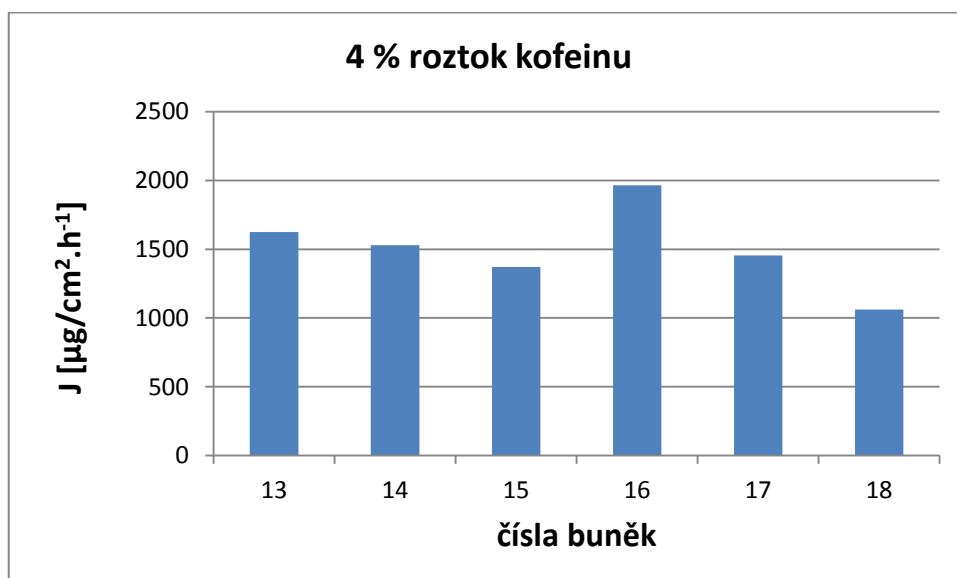
Obr. 6.5 Jednotlivé hodnoty fluxů kofeinu z 4% donorových vzorků



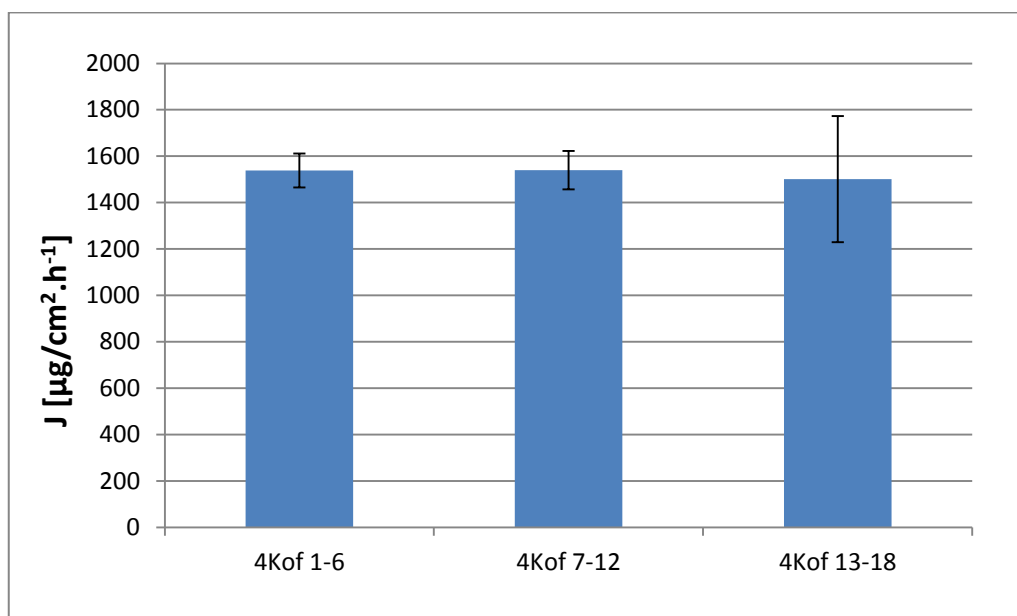
Obr. 6.6 Jednotlivé hodnoty fluxů FD40S z donorových vzorků 0,1 % + lecitin



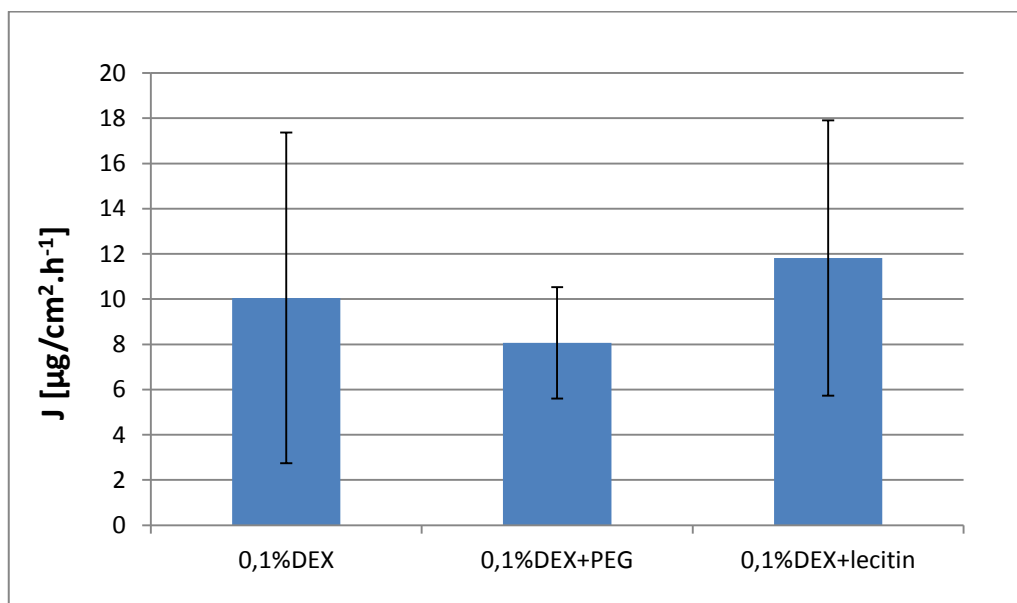
Obr. 6.7 Jednotlivé hodnoty fluxů kofeinu z 4 % donorových vzorků



Obr. 6.8 Průměrné hodnoty fluxů kofeinu



Obr. 6.9 Průměrné hodnoty fluxů dextransu FD40S



Ze získaných hodnot fluxů kofeinu i dextranu (viz protokoly v kap. 5. **Dokumentace**) prezentovaných také jednotlivě na **Obr. 6.2** až **6.7** byly pro názornost vytvořeny souhrnné grafy zobrazené na **Obr. 6.8** a **6.9**. K lepšímu posouzení jsme z hodnot jednotlivých fluxů pro příslušné podmínky vypočítali průměrné hodnoty fluxů J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$] a jejich směrodatné odchylky.

Z obou posledních obrázků je vidět, že průměrné hodnoty fluxů kofeinu jsou pro všechny membrány v jednotlivých podskupinách velice podobné a s velmi nízkou variabilitou. Rovněž u permeace dextranu FD40S jsou průměrné hodnoty fluxů přibližně stejné, a to v případě všech vehikul.

Domníváme se tedy, že polyethylenglykol 300 v koncentraci 20 % ani 1 % přídavek lecitinu permeaci uvedeného dextranu přes sublingvální membránu in vitro neovlivnily.

7 ZÁVĚRY

Z experimentálních výsledků vyplývají tyto závěry.

1. Průměrné hodnoty fluxů kofeinu použitého k 4 hodinovému permeačnímu ověření integrity a permeačního potenciálu vypreparovaných sublingválních membrán činily ve 3 podskupinách po 6 permeačních celách (n=6):

$$J = 1538,6 \pm 73,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$$

$$J = 1540,3 \pm 82,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$$

$$J = 1500,8 \pm 272,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$$

2. V rámci zmíněných podskupin nebyl patrný žádný vliv doby uchovávání vypreparovaných membrán v mrazničce (při -20°C) na hodnoty z permeačních pokusů.
3. Molekula dextranu FD40S je schopná průchodu přes sublingvální membrány in vitro.
4. K významnějšímu nárůstu koncentrace dextranu FD40S v akceptorové fázi docházelo až po 18 hodinách probíhající permeace.
5. Ve srovnání s nízkomolekulárním kofeinem byla permeace dextranu FH40S mnohem více variabilní.
6. Přídavek 20 % polyethylenglykolu 300 do donorových vzorků s 0,1 % dextranu FD40S průnik membránou významně neovlivnila.
7. Přídavek 1,0 % lecitinu do donorových vzorků s 0,1 % dextranu FD40S průnik membránou rovněž neovlivnila.

8. Průměrné hodnoty jednotlivých fluxů byly (n=6):

$$\text{Pro } 0,1 \% \text{ dextran} \quad J = 10,1 \pm 7,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$$

$$\text{Pro } 0,1 \% \text{ dextran s } 20 \% \text{ PEG } 300 \quad J = 8,1 \pm 2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$$

$$\text{Pro } 0,1 \% \text{ dextran s } 1 \% \text{ lecitinu} \quad J = 11,8 \pm 6,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$$

8 LITERATURA

¹<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf> [on line 23/02/2011]

² Lindenberga, M.; Koppb, S.; Dressmana, J. B. Classification of Orally Administered Drugs on the World Health Organization Model List of Essential Medicines According to the Biopharmaceutics Classification System. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, 58, 265-278.

³ Amidon, G. L.; Lennernäs, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. A Theoretical Basis For a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharm. Res.* **1994**, 12, 413-420.

⁴ Lincová, D.; Farghali, H. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie, druhé, doplněné a přepracované vydání*, Galen: Praha, CZ, 2007.

⁵http://www.wikiskripta.eu/index.php/P%C5%99%C3%ADvodn%C3%AD_cesty_l%C3%A9k%C4%8Diva_do_organismu [on line 24/02/2011]

⁶ Gandhi, R. B.; Robinson, J. R. Oral Cavity as a Site For Biadhesive Drug Delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* **1994**, 13, 43-74.

⁷ Patel, V. F.; Liu, F.; Brown, M. B. Advances in Oral Transmucosal Drug Delivery, *J. Control. Rel.* **2011**, 1-11 [on line 04/02/2011]

⁸ Salamat-Miller, N.; Chittchang, M.; Johnston, T. P. The Use of Mucoadhesive Polymers in Buccal Drug Delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* **2005**, 57, 1666-1691.

⁹ Hoogstraate, J.; Benes, L.; Burgaud, S.; Horriere, F.; Seyler, I. *Oral Transmucosal Drug Delivery* In: Hillery, A. M.; Lloyd, A. W.; Swarbrick, J. Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists. Taylor and Francis: New York, USA, 2001, pp. 186-204.

¹⁰ Madhav, N. V. S; Shakya, A. K.; Shakya, P.; Singh, K. Orotransmucosal Drug Delivery Systems: A Review. *J. Control. Rel.* **2009**, 140, 2-11.

-
- ¹¹ Morales, J.O.; McConville, J.T. Manufacture and Characterization of Mucoadhesive Buccal Films. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *77*, 187-199.
- ¹² Dixit, R. P.; Puthli, S. P. Oral Strip Technology: Overview and Future Potential. *J. Control. Rel.* **2009**, *139*, 94-107.
- ¹³ Comerford, D. Techniques of Opioid Administration. *Anaest. Intens. Care Med.* **2011**, *12*, 16-20.
- ¹⁴ Reisfield, G. M.; Wilson, G. R. Rational Use of Sublingual Opioids in Palliative Medicine. *J. Palliat. Med.* **2007**, *10*, 465-475.
- ¹⁵ Coluzzi, P. H. Sublingual Morphine: Efficacy Reviewed. *J. Pain Sympt. Man.* **1998**, *16*, 184-192.
- ¹⁶ Engelhardt, T.; Crawford, M. Sublingual Morfine May Be a Suitable Alternative for Pain Control in Children in the Postoperative Period. *Paediat Anaest.* **2001**, *11*, 81-83.
- ¹⁷ James, I. G. V.; O'Brien, C. M.; McDonald C. J. A Randomized, Double-Blind, Double-Dummy Comparison of the Efficacy and Tolerability of Low-Dose Transdermal Buprenorphine (BuTrans Seven-Day Patches) with Buprenorphine Sublingual Tablets (Temgesic) in Patients with Osteoarthritis Pain. *J. Pain Sympt. Man.* **2010**, *40*, 266-278.
- ¹⁸ Kraft, W. K.; Gibson, E.; Dysart, K.; Damle, V. S.; LaRusso, J. L.; Greenspan, J. S.; Moody, D. E.; Kaltenbach, K.; Ehrlich, M. E. Sublingual Buprenorphine for Treatment of Neonatal Abstinence Syndrome: A Randomized Trial. *Pediatrics.* **2008**, *122*, 601-607.
- ¹⁹ <http://www.medicines.org.uk/EMC/medicine/19265/SPC/Suboxone+Tablets+2mg+%26+8mg/> [on line 26/02/2011]
- ²⁰ <http://www.suboxone.com/> [on line 26/02/2011]
- ²¹ <http://www.rb.com/FDA-Approval-for-Suboxone-Sublingual-FilmC-III> [on line 26/02/2011]

-
- ²² http://suboxone-methadone-truth.com/index.php?p=1_4_Suboxone-Methadone-information [on line 26/02/2011]
- ²³ http://www.suboxone.com/patients/about_suboxone_tablets.aspx
[on line 26/02/2011]
- ²⁴ https://www.naabt.org/images/uploadedimage/Film_wide.jpg [on line 22/03/2011]
- ²⁵ Lennernäs, B.; Frank-Lissbrant, I.; Lennernäs, H.; Kälkner, K. M.; Derrick, R.; Howell, J. Sublingual Administration of Fentanyl to Cancer Patients is an Effective Treatment for Breakthrough Pain: Results from a Randomized Phase II Study. *Palliat. Med.* **2010**, 24, 286-293.
- ²⁶ Bredenberg, S.; Duberg, M.; Lennernäs, B.; Lennernäs, H.; Pettersson, A.; Westerberg, M.; Nyström, C. In Vitro and in Vivo Evaluation of a New Sublingual Tablet System for Rapid Oromucosal Absorption Using Fentanyl Citrate as the Active Substance. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, 20, 327-334.
- ²⁷ Darwish, M.; Kirby, M.; Jiang, J. G.; Tracewell, W.; Robertson P. Jr Bioequivalence Following Buccal and Sublingual Placement of Fentanyl Buccal Tablet 400 µg in Healthy Subjects. *Clin. Drug Invest.* **2008**, 28, 1-7.
- ²⁸ <http://www.orexo.com/en/Investor-Relations/Press-releases/?guid=548860>
[on line 26/02/2011]
- ²⁹ <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/21371/SPC/> [on line 26/02/2011]
- ³⁰ <http://www.empr.com/abstral-transmucosal-tablets-approved-for-breakthrough-cancer-pain/article/193973/> [on line 26/02/2011]
- ³¹ <http://en.wikipedia.org/wiki/Dextran> [on line 27/02/2011]
- ³² <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=22696471> [on line 27/02/2011]